SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG VON KOVALENT AN HÄMIN GEBUNDENEN IMIDAZOLHALTIGEN LIGANDEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Otfried Bihler
aus Stuttgart

1982

SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG VON KOVALENT AN HÄMIN GEBUNDENEN IMIDAZOLHALTIGEN LIGANDEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Otfried Bihler
aus Stuttgart

1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	3. November 1982
Dekan:	Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Jung

ABSTRACT

Bihler, Otfried

Synthese und Charakterisierung von kovalent an Hämin gebundenen imidazolhaltigen Liganden

Der Einfluß der Proteinkomponente bei der Funktion der natürlichen Sauerstoffüberträger Hämoglobin und Myoglobin soll durch Modelle erforscht werden, bei denen der Proteinanteil durch synthetische Polymere ersetzt wird.

Zwei imidazolhaltige Liganden, das API und ein Dipeptid der Sequenz H-His-Gly-OH werden synthetisiert. Diese werden mit verschiedenen Verfahren nacheinander an die Carboxylgruppen des Hämins gebunden. Anschließend wird das entstandene Molekül an ein POE mittleren Molekulargewichts geknüpft.
Wegen der zeit- und substanzraubenden Aufarbeitung durch präparative Säulenchromatographie ist die Ausbeute an POE-Gly-His-Hämin-API gering.

Eine Trennung und Aufarbeitung eines Reaktionsansatzes im Rahmen obiger Synthese durch HPLC kann nur im analytischen Maßstab erfolgreich durchgeführt werden. Wird das obige Modell vom POE aus synthetisiert, so ist der dazu notwendige Zeitaufwand viel geringer und die Ausbeute größer als bei der anderen Synthesestrategie. Jedoch kann durch NMR-Spektroskopie gezeigt werden, daß der Häminanteil geringer ist.

Bei den ^{1}H-NMR-Untersuchungen dieser Häminverbindungen werden chemische Verschiebungen bis zu 70 ppm beobachtet. Je nach Lösungsmittel und Zahl der ungepaarten Elektronen am Eisen werden charakteristische Resonanzmuster festgestellt. Diese sind besonders bei den Methylprotonen des Hämins ausgeprägt und lassen Rückschlüsse auf das Koordinationsverhalten der Imidazolliganden zu.

Durch Gaschromatographie kann nachgewiesen werden, daß POE-Gly-His-Hämin-API im Festzustand Sauerstoff binden kann, ohne nennenswert dabei oxidiert zu werden.

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Professor Dr. Ernst Bayer in der Zeit von Dezember 1976 bis Dezember 1979 am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Ernst Bayer, danke ich für die Stellung des Themas, seine großzügige Unterstützung und das rege Interesse an meiner Arbeit.

Der Bundesrepublik Deutschland danke ich für ein Graduiertenstipendium.

Herrn Dr. C. Homann, Dr. A. Gaede, und Dr. M. Schleinzer danke ich für wichtige Diskussionen und Ratschläge.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536519_0012

INHALTSVERZEICHNIS

A.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
B.	ALLGEMEINER SYNTHETISCHER TEIL	8
1.	Planung der "klassischen" Synthese von Polymer-Gly-His-Hämin-API	8
2.	Synthese der einzelnen Bestandteile	8
2.1.	Synthese eines Peptids der Sequenz H-His-Gly-OH	8
2.2.	Synthese von API	13
2.3.	Synthese der niedermolekularen Häminderivate	14
2.3.1.	Allgemeines zur Kupplung von Liganden an Porphyrine	14
2.3.2.	Synthese und Charakterisierung von Hämin-(API)-OMe	15
2.3.3.	Hämin-(API)-ONP	21
2.3.4.	Hämin-API-(His-Gly-OMe)	22
2.3.5.	POE_{20}-Gly-His-Hämin-API	25
2.3.6.	Hämin-(His-Gly-OMe)-OMe	25
2.4.	Synthese von POE-Gly-His-Hämin-API nach der LPM Zuordnung des ^1H NMR-Spektrums von POE_{12}-Gly-His-$NH_3^+AcO^-$	27
C.	HPLC TRENNUNG EINES REAKTIONSANSATZES	30
D.	NMR-UNTERSUCHUNGEN DER HÄMINVERBINDUNGEN	33
1.	Allgemeines zur Kernresonanzspektroskopie von paramagnetischen Verbindungen	33
1.1.	Die chemische Verschiebung von paramagnetischen Substanzen	33

1.2.	Die Linienbreite von NMR-Spektren paramagnetischer Verbindungen	38
2.	Diskussion und Zuordnung der NMR-Spektren der Häminverbindungen	39
2.1.	Die Diskussion und Zuordnung der ^{1}H-NMR-Spektren von Hämin in Pyridin-d_5 und DMF-d_7	39
2.2.	Diskussion und Zuordnung der NMR-Spektren der synthetisierten niedermolekularen Häminverbindungen	45
2.2.1.	Diskussion des ^{1}H-NMR-Spektrums von Hämin-(API)-OMe	45
2.2.2.	Diskussion und Zuordnung des ^{1}H-NMR-Spektrums von Hämin-diAPI	48
2.2.3.	Diskussion des NMR-Spektrums von Hämin-(His-Gly-OMe)-OMe	50
2.3.1.	Diskussion des ^{1}H-NMR-Spektrums von POE_3-Gly-His-Hämin-API	54
2.3.2.	Diskussionen des ^{13}C-NMR-Spektrums von POE_3-Gly-His-Hämin-API	56
E.	UNTERSUCHUNG DER REVERSIBLEN OXYGENIERUNG VON POE_{12}-Gly-His-Hämin-API IM FESTZUSTAND	57
F.	ZUSAMMENFASSUNG	60
G.	EXPERIMENTELLER TEIL	62
1.	Allgemeines	62
1.1.	Geräte und Instrumente	62
1.2.	Chemikalien und Reagenzien	64

2.	Arbeitsverfahren (allgemein)	66
2.1.	Dünnschichtchromatographie	66
2.2.	Anfärbereagenzien und Methoden	66
2.3.	Aminosäureanalysen	67
3.	Durchführung der Versuche	67
3.1.	Histidinmethylesterdihydrochlorid (H-His-OMe · 2 HCl)	67
3.2.	Glycinmethylester ·HCl (H-Gly-OMe · HCl)	68
3.3.	Boc-Glycin , (Boc-Gly)	68
3.4.	N^{α} -N^{im}-Di Boc-His-OH · DCA	69
3.5.	3-(1-Imidazolyl)propylamin-dihydrochlorid	70
3.6.	Z-His-$NHNH_2$	71
3.7.	Z-His-Gly-OMe	72
3.8.	Synthese der Häminderivate	73
3.8.1.	Hämin-(API)-OMe	73
3.8.1.1.	Ansatz I	73
3.8.1.2.	Ansatz II	73
3.8.1.3.	Ansatz III	75
3.8.2.	Hämin-(API)-ONP	75
3.8.3.	Hämin-(His-Gly-OMe)-OMe	76
3.8.3.1.	Abspaltung der Z-Schutzgruppe von Z-His-Gly-OMe	76
3.8.3.2.	Kupplung von H-His-Gly-OMe · 2 HCl an Hämin	76
3.8.4.	Hämin-diONP	77
3.8.5.	Hämin-(API)-His-Gly-OMe	78
3.8.5.1.	Verseifung von Hämin- (API)-OMe	78
3.8.5.2.	Kupplung von H-His-Gly-OMe an Hämin-(API)-OH	78
3.8.6.	Hämin-(API)-His-Gly-OMe	79
3.8.7.	POE_{20}-Gly-His-Hämin-API	79

3.9.	Synthese des Hämopolymers POE-Gly-His-Hämin-API nach der LPM	79
3.9.1.	POE_3-Gly-Boc	80
3.9.2.	POE_3-Gly-$NH_3^+AcO^-$	80
3.9.3.	POE_3-Gly-His(N^{im}Boc)N^{α}-Boc	80
3.9.4.	POE_3-Gly-His-NH_3^+ . AcO^-	81
3.9.5.	POE_3-Gly-His-Hämin	81
3.9.6.	POE_3-Gly-His-Hämin-API	81
3.10.	Versuch zum qualitativen Nachweis des gebundenen Sauerstoffs bei der reversiblen Oxygenierung von POE_{12}-Gly-His-Hämin-API im Festzustand	82
H.	LITERATURVERZEICHNIS	85
	LEBENSLAUF	

ABKÜRZUNGEN

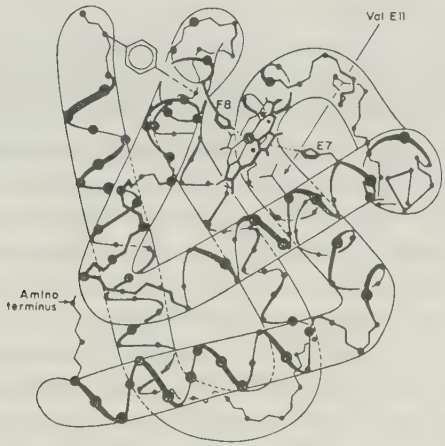
AAS	Atomabsorption
AcOH	Eisessig
API	3-(1-Imidazolyl)propylamin
Boc	tert. Butyloxycarbonyl
CT	Charge-Transfer
DCA	Dicyclohexylamin
DC	Dünnschichtchromatographie
DC-Harnstoff	Dicyclohexylharnstoff
DCCI	Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EI	Elektronenionisation
ESR	Elektronenspinresonanz
FD	Felddesorptionsionisation
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HPTLC-RP	Reversed-phase Dünnschichtchromatographie
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
IR	Infrarotspektroskopie
LPM	Liquid-phase Methode
Min	Minuten
MO	Molekülorbital
NMM	N-Methylmorpholin
NMR	Magnetische Kernresonanz
POE	Polyäthylenglykol
RF	Quotient der Laufstrecken Substanz: Lösungsmittel
RT	Raumtemperatur
TEA	Triäthylamin
UV	Ultraviolett
Z	Benzyloxycarbonyl

A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Leben kann nur durch ständige Energiezufuhr aufrecht erhalten werden. Die Energieeinheit des Lebens, das ATP wird bei heterotroph lebenden Organismen hauptsächlich durch den in den Mitochondrien ablaufenden Prozess der oxidativen Phosphorylierung erzeugt (1). Der dazu notwendige Sauerstoff muß bei höher entwickelten Lebewesen durch spezielle Transportmechanismen an die Zelle herangeschafft werden. Für die Aufgabe des Transports und der Lagerung von Sauerstoff kommen dabei den Hämoproteinen Hämoglobin (Hb) und Myoglobin (Mb) eine entscheidende Rolle zu (2).

Hb und Mb sind im Prinzip gleich aufgebaut. Sie bestehen aus einer Peptidkette (bei Mb), bzw. aus vier Peptidketten (bei Hb), in denen der Eisen(II)-Chelatkomplex des Protoporphyrins IX, das Häm, eingebettet ist. Abbildung 1 zeigt die Struktur und die Häminumgebung von einer die vier Peptidketten des Hbs. Die eine Kette vom Mb ist ähnlich aufgebaut.

Abbildung 1: Struktur und Häminumgebung einer Hb-Kette (3)



F8 = proximales Histidin; E7 = distales Histidin

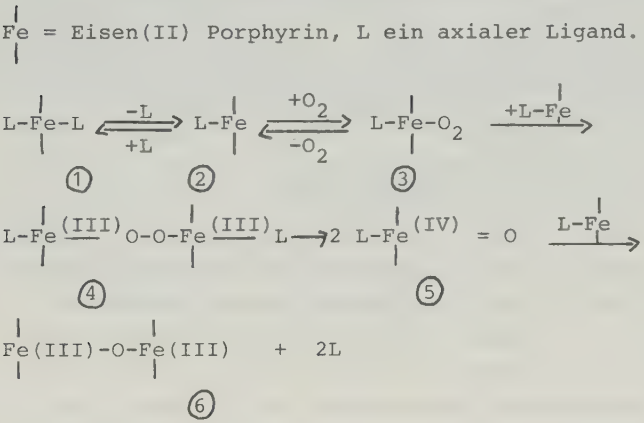
Im Innern der Peptidkette, deren Sekundärstruktur einen hohen α-Helix-Anteil aufweist, befindet sich, von zahlreichen unpolaren Aminosäureresten umgeben (apolare Tasche), das Häm. Die einzige direkte Verbindung des Häms zur Peptidkette kommt durch Ausbildung einer koordinativen Bindung zwischen dem N-Atom eines Imidazolrestes eines in der Peptidkette befindlichen Histidinmoleküls ("proximales" Histidin, F8) zustande. Auf der anderen Seite des Häms wird das Sauerstoffmolekül als 6. Ligand an das Hämeisen gebunden. In der Nähe der Sauerstoffbindungsstelle kommt ein weiterer Imidazolrest eines Histidinmoleküls vor, der, ohne mit dem Hämeisen direkt in Kontakt zu treten, einen Einfluß auf die Stabilität des Sauerstoffaddukts am Häm haben soll ("distales" Histidin, E7).

Obwohl Hb und Mb zu den am besten untersuchten Biomolekülen gehören, und Struktur und Wirkungsweise weitgehend bekannt sind, ist es immer noch ein großes und interessantes Problem, wie das Hämeisen den Sauerstoff binden und wieder abgeben kann, ohne zur normalerweise thermodynamisch stabilem Fe(III)-Form oxidiert zu werden.

Um festzustellen, welche Rolle der Proteinanteil dabei bewirkt und zum besseren Verständnis der Wirkungsweise von Mb und Hb versucht man, das eigentliche Aktivzentrum durch synthetische Modelle zu ersetzen, die die gleichen Bestandteile des Aktivzentrums haben, aber viel einfacher aufgebaut sind. Der Erfolg dieses Vorgehens ergibt sich durch Vergleich des einfachen Modells mit dem "Original" hinsichtlich struktureller, chemischer und spektroskopischer Eigenschaften. Die ersten, einfachen Modelle ergaben: In Abwesenheit von axialen, stark koordinierenden Liganden, wie Pyridin werden einfache Fe(II)-Porphyrine ohne nachweisbare Bildung eines Sauerstoffaddukts bei RT irreversibel zu Fe(III)-Porphyrinen oxidiert (4), während Fe(II)-Porphyrine mit einem großen Überschuß an stark koordinierenden

Liganden(Hämochromogene) in unpolaren Medien (Nachahmung der apolaren Tasche) unfähig sind, mit Sauerstoff zu koordinieren (5,6).

Nachdem das bei der Oxidation entstehende Produkt aufgeklärt worden war (7-10) (Nr. 6 im folgenden Reaktionsschema), wurde auf Grund kinetischer Messungen (11-13) folgender Mechanismus für die irreversible Oxidation in unpolaren Medien vorgeschlagen:



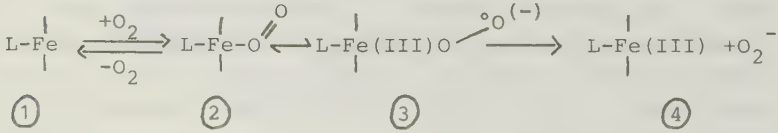
Der für die irreversible Oxidation entscheidende Schritt ③ → ④ konnte durch folgende Maßnahmen umgangen werden:

1) Einbau von sperrigen Gruppen in die Porphyrinzentren, welche die Annäherung ③→④ , (die "Dimerisierung") verhindern sollen (14-28).
2) Tiefe Temperaturen(< -20° C), da ③→④ langsam verläuft (29-35).
3) Fixierung der Porphyrinkomplexe an festen Oberflächen (Immobilisierung) (36-38).
4) Einbau der Porphyrine in künstliche Polymere, wobei durch die Struktur der Polymere das Sauerstoffaddukt stabilisiert und ③→④ verhindert wird (39-55).

Jedoch waren diese Hb bzw. Mb Modelle gegenüber dem "Original" immer noch zu oxidationsempfindlich. Daraus konnten vier für das Funktionieren von Hb bzw. Mb bedeutsame Faktoren gewonnen werden:

a) Der Einbau des Häms in eine kompakte Proteinmatrix unterbindet den Schritt ③⟶④ .
b) Die 6. Koordinationsstelle des Eisens sollte entweder frei sein, oder durch einen schwachen Liganden besetzt sein, da sonst das Gleichgewicht ①⟺② zu sehr nach ① verschoben wird.
c) Imidazolhaltige Liganden trans zum gebundenen Sauerstoff sind für das Zustandekommen einer stabilen Eisen-Sauerstoff-Bindung notwendig (Bedeutung des proximalen Histidins).
d) Polare, aprotische Lösungsmittel haben einen zusätzlich stabilisierenden Effekt.

Obwohl die relativ starre Proteinmatrix des Hb's bzw. Mb's den Schritt ③⟶④ vollständig verhindert, wird durch die Anlagerung von O_2 ständig ein kleiner Teil des Fe(II) zu Fe(III) oxidiert, wobei Met-Hb bzw. Met-Mb entstehen, welche durch spezifische Reduktasen wieder zu Hb bzw. Mb reduziert werden (56). Dies führte zur Postulation eines zweiten Oxidationsmechanismus (57-61), der wie folgt formuliert wurde:



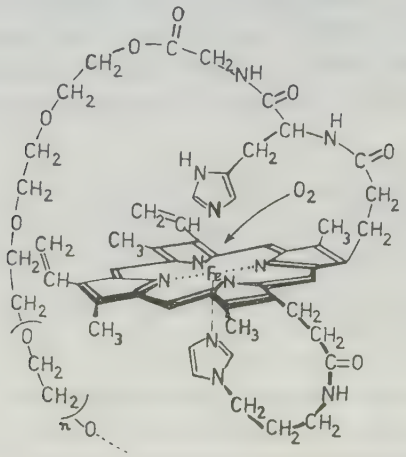
Schritt ③⟶④ wird in aciden, polaren Medien sehr begünstigt und dürfte der Hauptgrund für die irreversible Oxidation vieler Fe(II)-Porphyrinkomplexe in diesen Medien (Wasser, Alkohole) sein, selbst wenn der dimere Oxidationsmechanismus sterisch unmöglich ist. Aus diesem Grund liegt

das Häm in einer hydrophoben Umgebung bei Hb bzw. Mb. Die Formulierung des Sauerstoffaddukts (2) als Fe(III)-O_2^- (3) (62) wurde aus IR-Messungen an oxygeniertem Hb bzw. Mb und an Modellsubstanzen abgeleitet (63-65). Da dies als "Dipol" angesehen werden kann, wird verständlich, daß polare, aprotische Lösungsmittel diese Grenzstruktur und damit das Sauerstoffaddukt durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen stabilisieren können (Faktor d). Im Mb bzw. Hb soll diese Stabilisierung das distale Histidin übernehmen (66,67).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß wirkungsvoll voneinander getrennte Eisenporphyrinzentren mit Imidazolliganden, eingebettet in eine Umgebung die sowohl hydrophobe wie polar aprotische Bezirke aufweist, am besten als Sauerstoffüberträger geeignet wären.
Dies ließe sich durch Einbau der Porphyrine in Polymere erreichen. Wählt man die Polymere geeignet aus und führt passende funktionelle Gruppen ein, so wäre es möglich, daß Sauerstofftransport und Sauerstoffanlagerung in wässrigem Milieu stattfinden kann.
Diese Polymere könnten dann wie der Proteinanteil des Hb's bzw. des Mb's das sauerstoffbindende Zentrum von der wässrigen Umgebung isolieren. Damit wäre auch ein Weg in Richtung künstlichen Blutersatz gegeben.
Dieses Konzept wurde neben (41-48), (50) vor allem von Bayer et al. (51-55) verwirklicht. Ein Modell, das im wesentlichen alle strukturellen Bestandteile des Aktivzentrums von Hb bzw. Mb aufweist, zeigt Abbildung 2.
Es wurde, ausgehend vom Polymer POE (um das Modell wasserlöslich zu halten), durch sukzessives An kuppeln von Glycin, Histidin, Hämin und API nach der modifizierten LPM (68) synthetisiert. Nach Reduktion des Fe(III) im Hämin zu Fe(II) erwies sich dieses Hämopolymer als reversibel oxygenierbar, war aber gegenüber dem Hb bzw. Mb zu oxidationsempfindlich. Um es zu verbessern, kommt, neben einer weiteren Funktionalisierung des POE durch Einbau

weiterer Aminosäuren, dessen Ersatz durch andere Polymere in Frage.

Abbildung 2: Hb-Modell nach Bayer und Holzbach (51,52)



Nun wird die Synthesestrategie eines Hämopolymers mit POE als Grundpolymer hauptsächlich durch die Eigenschaften des POE bestimmt, und kann bei Ersatz des POE durch andere Polymere nicht ohne weiteres übernommen werden. Hinzu kommt, daß solche am Polymer synthetisierten Substanzen nicht als Reinstoffe im eigentlichen Sinne angesehen werden können. Bei einem ähnlichen Hämopolymer (69) ergaben sich nach Abspaltung vom POE statt des erwarteten einen mehrere Produkte. Der Einfluß der Heterogenität auf die Oxygenierungseigenschaften der Modelle kann nicht ohne weiteres überblickt werden.

Es soll daher in dieser Arbeit versucht werden, das obige Modell "klassisch", d.h. ohne vom Polymer ausgehend aufzubauen und Produkte und Syntheseschritte mit den analytischen

Methoden der organischen Chemie (Elementaranalyse, DC, NMR, MS, IR) zu charakterisieren, die bei Synthesen am Polymer nur eingeschränkt anwendbar sind. Erst zum Schluß sollte dies an ein geeignetes Polymer geknüpft und die Oxygenierungseigenschaften untersucht werden. Gleichzeitig sollte aber im Auge behalten werden, ob man die vom POE synthetisierten Produkte nicht durch geeignete Techniken (z.B. für POE modifizierte NMR-Techniken) besser charakterisieren kann, da deren Synthese viel einfacher ist. Da sich der Nachweis der Oxygenierung bei den bisher am Polymer synthetisierten Hämopolymere auf UV-Messungen in Lösung beschränkte, und das Oxygenierungsverhalten im Festzustand bei diesen Modellen nicht untersucht worden ist, soll die Reversibilität der Oxygenierung im Festzustand durch direkten Nachweis des gebundenen Sauerstoffs mittels Gaschromatographie in einer modifizierten "Headspace"-Technik (70) geprüft werden.

B. ALLGEMEINER SYNTHETISCHER TEIL

1. Planung der "klassischen" Synthese von Polymer-Gly-His-Hämin-API

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, dieses Molekül aufzubauen ohne vom Polymer aus zu beginnen. Eine Möglichkeit wäre, ausgehend vom Hämin, das man käuflich erwerben oder aus Rinderblut isolieren kann (71) nacheinander die (mit den jeweiligen Schutzgruppen versehenen) Aminosäuren Histidin und Glycin zu binden und dann API, oder umgekehrt. Bei Häminderivaten kann zur Reinigung und Isolierung meist nur eine präparative Säulenchromatographie benutzt werden, die zeitraubend und verlustreich ist. Deswegen ist es vorteilhafter, zuerst eine Dipeptidsequenz H-His-Gly-OH aufzubauen und diese mit der Aminogruppe an eine Carboxylgruppe des Hämins zu binden. Dann wird die andere Carboxylgruppe des Hämins mit API verknüpft und zum Schluß das Polymer an die Carboxylgruppe des Glycins gebunden. Abbildung 3 zeigt eine Zusammenstellung der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen mit den entsprechenden Abkürzungen.

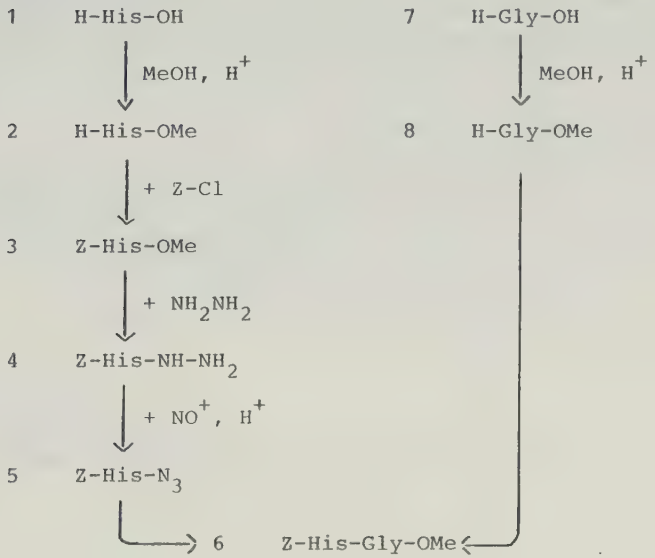
2. Synthese der einzelnen Bestandteile

2.1. Synthese eines Peptids der Sequenz H-His-Gly-OH

Die Synthese von Histidinpeptiden bereitet wegen des nucleophilen Verhaltens des Imidazolringes und seiner katalytischen Eigenschaften immer Probleme. Hinzu kommt das allgemein schlechte Kristallisationsverhalten imidazolhaltiger Substanzen. Ist Histidin C-terminale Komponente, so lassen sich diese Schwierigkeiten in Grenzen halten. Muß wie hier, Histidin als aminoendständige Komponente zur Knüpfung der Peptidbindung an der Carboxylgruppe aktiviert werden, treten große Schwierigkeiten auf. Diese lassen sich teil-

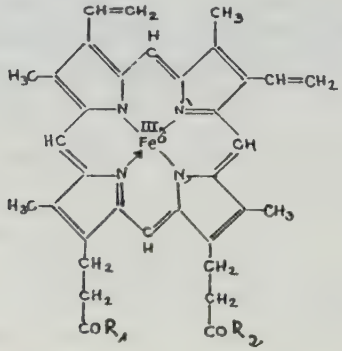
weise durch Blockierung der N-H-Gruppe des Histidins (72) beseitigen. Da jedoch das Peptid später an das Hämin gebunden werden soll und nicht abzusehen ist, wie das Hämin die Schutzgruppenabspaltung "überlebt", bleibt nur der Weg, die Kupplung mit der Azidmethode (73) vorzunehmen, da andere Methoden bei ungeschütztem Imidazol (DCCI, gemischtes Anyhdrid) schlechte bis keine Ausbeuten an Histidinpeptid liefern (74).

Das Peptid wurde nach folgendem Plan aufgebaut:



Es werden zuerst die Methylester beider Aminosäuren dargestellt. Die α-Aminogruppe des Histidins wird mit der Z-Schutzgruppe acyliert, der Methylester hydrazinolysiert. Während Schritte 1 $\longrightarrow$ 4, 7 $\longrightarrow$ 8 problemlos verliefen, bereitete 4 $\longrightarrow$ 6 mehr Probleme. Führte man die Azidkupplung nach (73,75) durch, so ergaben sich nur unreine Produkte, obwohl bei der Bildung des freien Glycinesters aus dem Hydrochlorid verschiedene Verfahren angewendet wurden (76).

Abbildung 3: Zusammenstellung der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen mit den entsprechenden Abkürzungen.



R_1= OH	R_2= OH	Hämin
R_1= -O-⟨⟩-NO_2	R_2= -O-⟨⟩-NO_2	Hämin-diONP
$R_1(R_2)$= NH-CH_2-CH_2-CH_2-⟨N⟩	$R_2(R_1)$= -O-CH_3	Hämin-(API)-OMe
R_1= NH-CH_2-CH_2-CH_2-⟨N⟩	R_2= NH-CH_2-CH_2-CH_2-⟨N⟩	Hämin-diAPI
$R_1(R_2)$= -O-⟨⟩-NO_2	$R_2(R_1)$= NH-CH_2-CH_2-CH_2-⟨N⟩	Hämin-(API)-ONP
$R_1(R_2)$= NH-CH_2-CH_2-CH_2-⟨N⟩	$R_2(R_1)$= NH-CH(-CH_2-⟨H-N⟩)-C(=O)-NH-CH_2-C(=O)-O-CH_3	Hämin-(API)-His-Gly-OMe
R_1= NH-CH(-CH_2-⟨H-N⟩)-C(=O)-NH-CH_2-C(=O)-O-CH_3	R_2= NH-CH(-CH_2-⟨H-N⟩)-C(=O)-NH-CH_2-C(=O)-O-CH_3	Hämin-diHis-Gly-OMe
$R_1(R_2)$= NH-CH(-CH_2-⟨H-N⟩)-C(=O)-NH-CH_2-C(=O)-O-CH_3	$R_2(R_1)$= -O-CH_3	Hämin-(His-Gly-OMe)-OMe

Nach (77) reagiert der freie Glycinester sehr leicht zu Polyglycin, da er von allen Aminosäuren sterisch am ungehindertsten ist. Das Verfahren nach (78) mit Alkylnitriten erwies sich für die Kupplung als optimal. Das Produkt war einheitlich, obwohl die Ausbeute nur 60 % betrug.

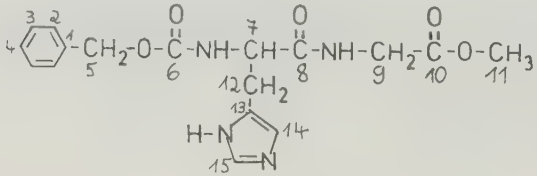
Ein Versuch, das Dipeptid durch Umsetzen von N^{α}-Boc-(N^{im}Boc) His-OH und H-Gly-OMe mittels der für LPM und Festkörperpeptidsynthesen bewährten DCCI-Methode darzustellen, scheiterte, da der DC-Harnstoff nicht quantitativ zu entfernen war.

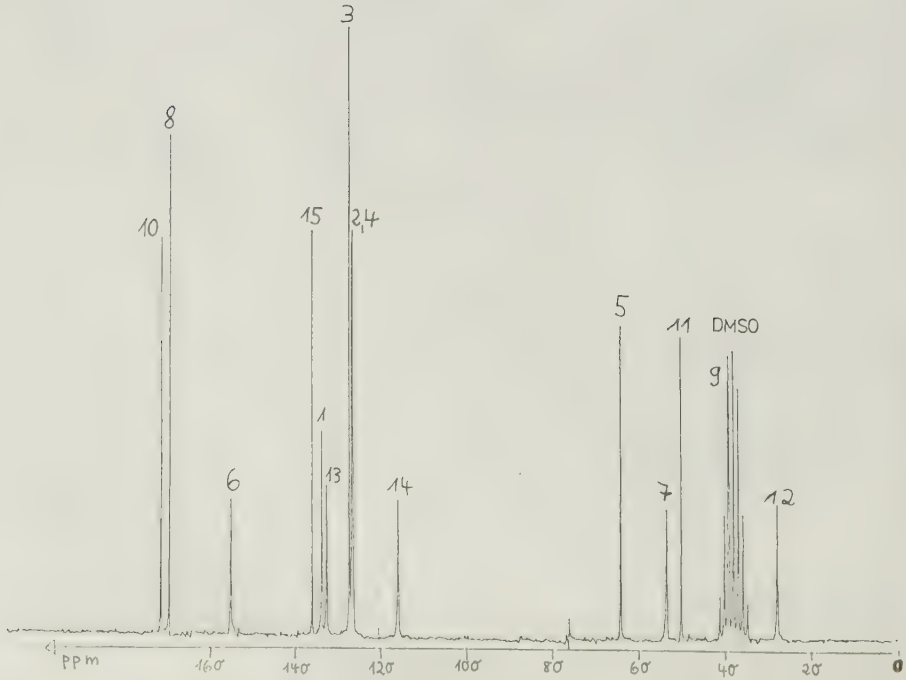
Abbildung 4 zeigt das ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-His-Gly-OMe.

Abbildung 4: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-His-Gly-OMe im DMSO-d_6
Innerer Standard: DMSO-d_6

δ-Werte bezüglich TMS (ppm)

10 = 171,98	13 = 133,50	5 = 65,47
8 = 170,11	3 = 128,28	7 = 54,84
6 = 155,73	2 = 127,65	11 = 51,60
15 = 136,91	4 = 127,42	9 = 40,75
1 = 134,70	14 = 116,96	12 = 29,61

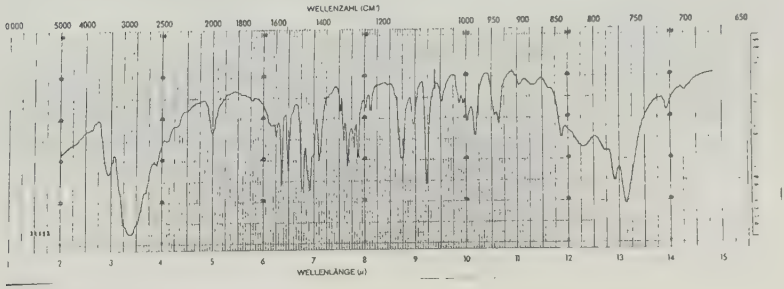




2.2. Synthese von API

Während das Histidin des Dipeptids das "distale" Histidin in diesem Mb- bzw. Hb-Modell darstellt, wird das proximale Histidin von API modelliert. Dieses wird nach (78) durch Michael-Addition von Imidazol an Acrylnitril dargestellt. Anschließend wird das Nitril katalytisch zum primären Amin hydriert. Die Hydrierung muß aber, im Gegensatz zur Vorschrift, bei höheren Wasserstoffdrücken durchgeführt werden.

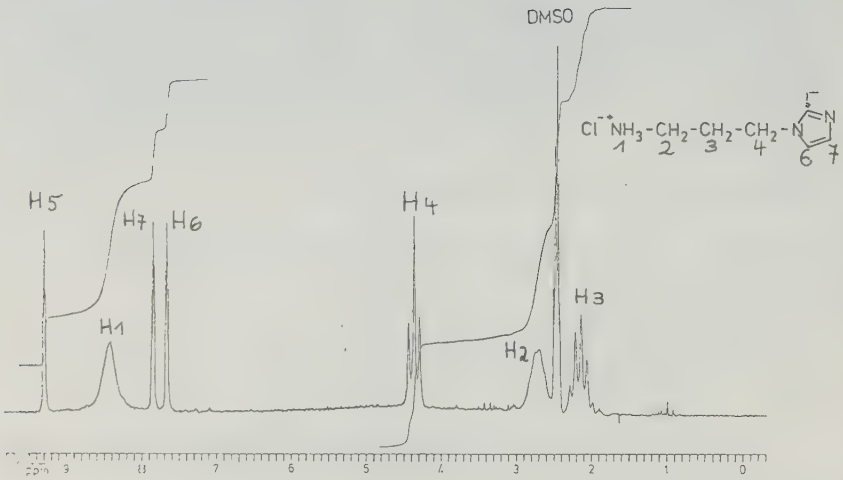
Abbildung 5: IR-Spektrum von API (KBr)



Charakteristische Schwingungsbanden:

2400 cm^{-1}:	N-H-Valenzschwingung
3200 2800 cm^{-1}:	O-H-(Wasser) und C-H-Valenzschwingung
2000 cm^{-1}:	$(N-H)^{+}$-Schwingung
1600, 1587 cm^{-1}:	C=C und C=N-H-Schwingung cyclisch konjugierter Systeme.

Abbildung 6: ^{1}H-NMR-Spektrum von API in DMSO-d_6
Referenz: DMSO-d_6



2.3. Synthese der niedermolekularen Häminderivate

2.3.1. Allgemeines zur Kupplung von Liganden an Porphyrine

Wegen der Bedeutung von Porphyrinen als prosthetische Gruppe haben schon einige Arbeitsgruppen Histidinderivate, kleinere histidinhaltige Peptide und Imidazolliganden kovalent an Porphyrine, bzw. Metalloporphyrine gebunden (32,35,79-95). Es wird meistens eine Peptidbindung zwischen einer Carboxylgruppe am Porphyrin und der Aminogruppe des betreffenden Liganden hergestellt. Bei den bisher mitgeteilten Arbeitsvorschriften bestehen aber erhebliche Unterschiede hinsichtlich Synthese und Reinigung solcher Substanzen.

Hat das betreffende Porphyrin nur eine Carboxylgruppe, oder sollen bei Porphyrinen mit zwei gleichen Carboxylgruppen (Proto-, Meso-, Deutero-porphyrin) bzw. ihren Metallkomplexen zwei gleiche Liganden gebunden werden, so erwiesen sich solche Synthesen als unproblematisch (siehe jedoch (94)). Weitaus schwieriger ist die Aufgabe, zwei verschiedene Liganden an das Porphyrin zu binden, da zuerst die betreffende mono-Verbindung benötigt wird. Diese entstehen zwar als Nebenprodukte in geringen Mengen bei der Synthese der disubstituierten Derivate, wo die Liganden im Überschuß eingesetzt werden. Will man die Synthese zu Gunsten der mono-Verbindung lenken, so kommt außer einer Erhöhung des Konzentrationsverhältnisses Porphyrin:Ligand (wobei viel Porphyrin nicht umgesetzt wird) nur die Synthese eines intramolekularen Anhydrids zwischen beiden Propionsäureresten in Frage, was praktisch schwierig ist. Es ist wegen der gleichen Reaktivität beider Carboxylgruppen nicht möglich, diese selektiv zu aktivieren oder zu blockieren, wie man das bei der Asparaginsäure oder Glutaminsäure erreichen kann.
Im Fall des Hämins kommen von den in der Peptidchemie üblichen Kupplungsreagentien nur DCCI oder gemischte Anhydride in Betracht, da bei Säurechlorid, Azid oder dem DMF/SO_3 Verfahren (82,83) wegen der empfindlichen Vinylgruppen mit Nebenreaktionen zu rechnen ist (93).

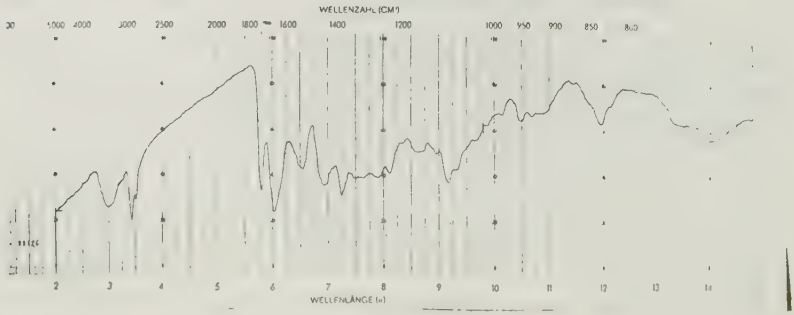
2.3.2. Synthese und Charakterisierung von Hämin-(API)-OMe

Hämin wurde in DMF bei Temperaturen von 0° - 5° C mit einem halben Äquivalent API mit DCCI oder verschiedenen Chorameisensäureestern umgesetzt. Die Synthesen wurden mit DC-Platten verfolgt. Dabei zeigte es sich, daß nach Abschluß der Synthese im Rohprodukt beim DCCI-Verfahren mehr Substanzen waren, als beim gemischten Anhydridverfahren. Wie durch IR-Spektren festgestellt wurde, konnte beim DCCI-Verfahren kein Hämin-API-OMe erhalten werden. Gereinigt wurden

hier die Ansätze durch Säulenchromatographie mit Aluminiumoxid oder Kieselgel und Benzol/Methanol-Gradienten. Das einzige in größeren Mengen erhaltene Produkt war Hämin-di-API. Damit erwies sich DCCI zur Kupplung niedermolekularer Liganden an das Hämin als nicht geeignet. Dies wurde bei ähnlichen Versuchen von anderen Arbeitsgruppen bestätigt (84,86,95), die vermuten, daß bei der DCCI-Aktivierung der Carboxylgruppen von Hämin und anderen, zwei Carboxylgruppen enthaltenden Porphyrinen bevorzugt intermolekulare Anhydride bilden, deren Umsetzung mit Aminogruppen schwierig zu steuern ist.

Besser war das Resultat, wenn Chlorameinsensäureester zur Aktivierung benutzt wurden. Mit Kieselgel und Chloroform/Methanol-Gradienten konnten, außer kleinen Verunreinigungen, drei Hauptfraktionen erhalten werden. Die erste Fraktion erwies sich durch Vergleich mit Literaturdaten (95) als Häminmethylester. Da bei der Synthese kein Methanol verwendet wurde, muß sich aus unumgesetztem Hämin während der Elution mit den methanolhaltigen Gradienten der Ester gebildet haben. Fraktion III erwies sich als identisch mit Hämin-di API, während Fraktion II aufgrund des IR-Spektrums als Hämin-(API)-OMe angesehen werden konnte.

Abbildung 7: IR-Spektrum von Hämin-(API)-OCH_3 (KBr)



Charakteristische Schwingungen:

3300 cm^{-1}: N-N-Valenzschwingung

2800 cm^{-1}: C-H-Valenzschwingung

1730 cm^{-1}: C=O-Valenzschwingung (Ester)

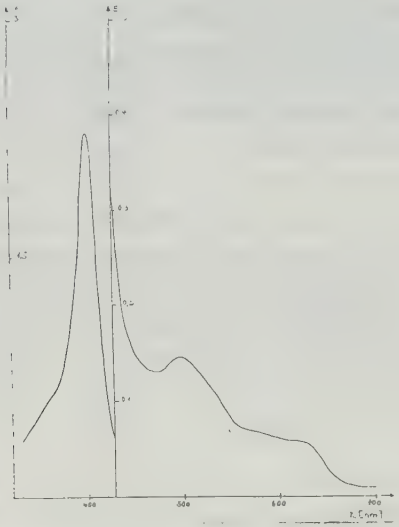
1650 cm^{-1}: C=O-Valenzschwingung (Amid I)

1520 cm^{-1}: N-H-Schwingung (Amid II)

Eine weitere Bestätigung, daß es sich um die gewünschte Verbindung handelt, ergab ein FD-Massenspektrum (wegen der geringen Flüchtigkeit von Häminderivaten kommen EI-Methoden mit direktem oder indirektem Einlaß nicht in Frage). Neben dem M^+ Signal bei 773 erscheint ein Signal bei 738, da durch die hohe Temperatur (82° C) bei einem Teil des Produkts das Cl^- Ion abgespalten wird.

Relativ große Abweichungen bei der Elementaranalyse zwischen berechneten und gefundenen Werten wurden bei allen niedermolekularen Häminderivaten beobachtet. Jedoch erlaubt der unterschiedliche Stickstoffgehalt eine Unterscheidung zwischen mono- und disubstituiertem Produkt. Das UV-Spektrum dieser Verbindung zeigt Abbildung 8.

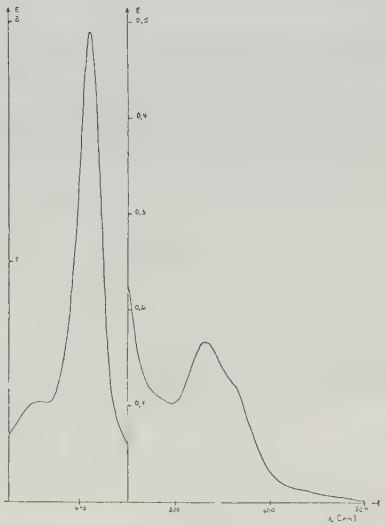
Abbildung 8: UV-Spektrum von Hämin-(API)-OMe in $CHCl_3$/MeOH 7 : 3



Aufgrund der Lage und der Intensität der Bandenmaxima (λmax. bei 405, 500 und 635 nm) ähnelt es sehr den UV-Spektren von high-spin Met-Mb bzw. Met-Hb, und anderen 5-fach koordinierten high-spin-Fe(III)-Porphyrinen (97). Damit unterscheidet es sich deutlich von low-spin Met-Hb bzw. Met-Mb, bei denen die 6. Koordinationsstelle von starken Liganden besetzt ist (wie CN^- oder Imidazol), oder von "Hämichromogenen" mit zwei gleich starken Liganden (98).

Ein Beispiel für ein solches Hämichromogen ist das Hämin-diAPI, dessen UV-Spektrum Abbildung 9 zeigt.

Abbildung 9: UV-Spektrum von Hämin-diAPI in $CHCl_3$/MeOH 7 : 3



Typisch für low-spin Hämichromogene ist im sichtbaren Bereich der Peak bei 535 nm mit einer ausgeprägten Schulter bei 565 nm. Diese entsprechen den bei diamagnetischen Metallporphyrinen in diesen Wellenbereichen vorkommenden ß- und α-Banden. Die intensive Bande bei 400 nm, die bei allen Porphyrinen und Metalloporphyrinen vorkommt (Soret-Bande) ist bei low-spin Fe(III)-Porphyrinen gegenüber den high-spin Fe(III)-Porphyrinen etwas bathochrom verschoben. Sowohl Soretbande wie die Banden bei 535, 565 nm (low-spin Fe(III)) und 500 nm high-spin Fe(III) sind im wesentlichen $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergängen im Porphyrin-Orbitalsystem zuzurechnen. Zusätzlich gibt es bei Fe(III) Porphyrin noch CT-Banden (a_{2u} (π), a_{1u} (π) Porphyrin $\longrightarrow$ $e_g(d_{xz}, d_{yz})$ Metall) .

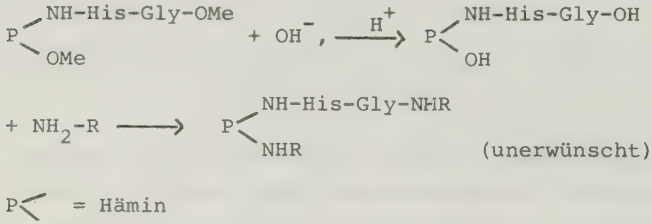
Diese liegen bei den high-spin Fe(III) Porphyrinen im sichtbaren Bereich bei 635 nm, während sie bei low-spin Fe(III) Porphyrinen im nahen IR liegen (99).

Das ^{1}H-NMR-Spektrum von Hämin-(API)-OMe wird im NMR-Abschnitt der Arbeit diskutiert.

Die bei der Chromatographie beobachtete Veresterung freier Carboxylgruppen wurde auch bei (100) beobachtet.

Daraus ergeben sich für weitere Synthesen folgende Konsequenzen:

1) Vor der Kupplung des Dipeptids an das Hämin muß eine Esterverseifung durchgeführt werden.
2) Wird an das Hämin zuerst das am C-terminalen Ende mit einem Ester geschützte Dipeptid gebunden, so wird dessen Ester bei der Verseifung auch abgespalten, und die weitere Umsetzung mit einem Liganden ergibt Probleme.



Die geringe Ausbeute an dem eigentlich gewünschten Hämin-(API)-OMe im Gegensatz zum "unerwünschten" Nebenprodukt Hämin-di^{API} ist ein unerfreulicher Aspekt dieser Synthese. Weiterhin wurde festgestellt, daß sehr viel Substanz irreversibel auf der Chromatographiesäule hängen bleibt. Dies wurde auch von Hasegawa (49) beschrieben, und kann mit sehr starken Wechselwirkungen der Silanolgruppen des Kieselgels mit dem Porphyrinsystem des Hämins erklärt werden. Um die Ausbeuten an mono-Produkt zu erhöhen, wurde, bei unveränderten

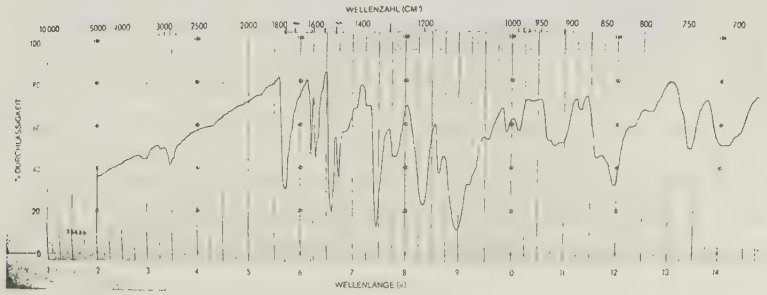
Kupplungsbedingungen ein Ansatz mit stöchiometrischem Verhältnis (COOH) : (API) = 4 : 1 durchgeführt, jedoch war das Ergebnis nicht besser.

2.3.3. Hämin-(API)-ONP

Von einer Arbeitsgruppe (84) ist Hämin-diONP hergestellt worden und dieser "Aktivester" wurde mit Aminosäureestern zu Hämin-di Aminosäureester umgesetzt. Über ein Syntheseprodukt, bei der nur eine der p-Nitrophenylestergruppen des Hämin-di ONP's mit einem Aminosäureester reagiert hat, wurde nicht berichtet. Aktivester dienen in der Peptidchemie als "unechte Schutzgruppe" und als Kupplungsreagens, müssen aber erst mit DCCI oder dem gemischten Anhydridverfahren dargestellt werden. Die weniger reaktiven Ester, wie der p-Nitrophenylester sind gegen Alkoholyse beständig und reagieren nur mit stärker basischen Aminoverbindungen. Durch Umsetzung mit API könnte man Hämin-API-ONP herstellen. Damit wäre die andere Carboxylgruppe des Hämins vor der unerwünschten Methanolveresterung geschützt und könnte dann mit dem Dipeptid umgesetzt werden.

Hämin wurde nach Vorschrift (84) zu Hämin-diONP umgesetzt. Das IR-Spektrum dieser Verbindung zeigt Abbildung 10.

Abbildung 10: IR-Spektrum von Hämin-diONP



Charakteristische Schwingungen:

3100 cm^{-1}:	C-H-Valenzschwingung
1750 cm^{-1}:	C=O-Valenzschwingungen (Phenylester)
1610 cm^{-1}, 1587 cm^{-1}:	C=C-Valenzschwingungen (aromatisch)

Diese Verbindung wurde mit 1 Äquivalent API umgesetzt, und auf einer Aluminiumoxidsäule mit Chloroform/Benzol/Methanol-Gradienten gereinigt. Außer unumgesetztem Ausgangsprodukt wurde wieder Hämin-di API in größeren Mengen erhalten, während die Ausbeute von Hämin-(API)-ONP zu wünschen übrig ließ.
(IR-Spektrum dieser Verbindung: 1750 cm^{-1}: C=O (Phenylester), 1660 cm^{-1}: C=O Amid I, 1530 cm^{-1}: NH Amid (II)).

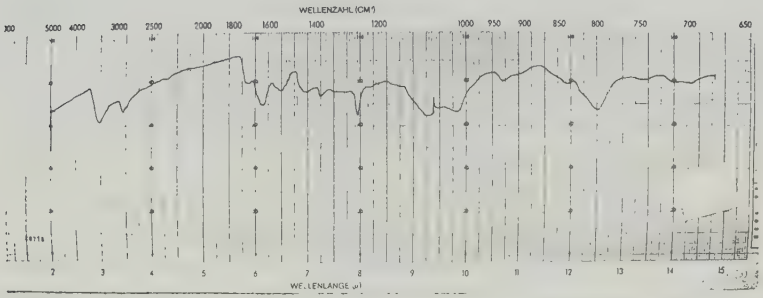
In einem Testversuch wurde diese Substanz mit H-His-Gly-OMe in DMF umgesetzt. Nach 48 h ergab sich aber, wie durch DC festgestellt wurde, kein nennenswerter Umsatz.
Offenbar ist die Aminogruppe dieses Dipeptids zu wenig nucleophil um die ONP-Gruppe beim Hämin zu substituieren. Basizität und Nucleophilie der α-Aminogruppe bei Aminosäuren und Peptiden sind durch den —I-Effekt der Carbonylgruppe herabgesetzt, die ihrerseits durch den —I-Effekt der α-Aminogruppe reaktiver ist (101). (Bekanntlich ist der pK_b Wert der α-Aminogruppe bei Aminosäuren größer, und der pK_S Wert der COOH-Gruppe kleiner, als bei normalen Carbonsäuren oder Aminen) Dies erklärt, warum Hämin-di ONP mit der Aminogruppe des API's reagiert hat, während die ONP-Gruppe des Hämins mit der Aminogruppe des Dipeptids keine Reaktion zeigte.

2.3.4. Hämin-API-(His-Gly-OMe)

Zur weiteren Umsetzung von Hämin-(API)-OMewurde der Ester mit 0,1 n NaOH verseift. Im IR-Spektrum (Abbildung 11) ist, trotz der schlechten Auflösung, zu erkennen, daß die C=O-

Esterbande verschwunden ist und bei 1710 cm^{-1} die C=O-Schwingung der Carboxylgruppe auftritt.

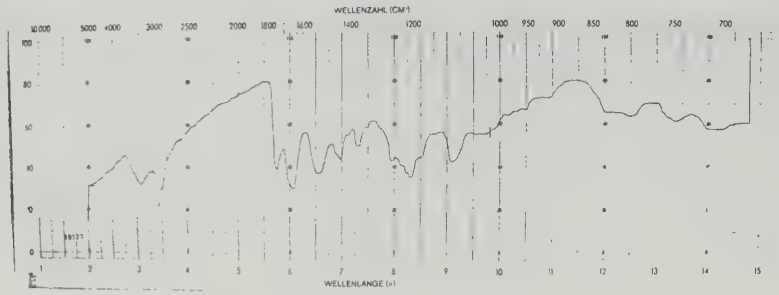
Abbildung 11: IR-Spektrum von Hämin-(API)-OH



Aus Z-His-Gly-OMe wird durch katalytische Entacylierung H-His-Gly-OMe erhalten. Die Hydrierung muß in Gegenwart von HCl durchgeführt werden, um die bei freien Dipeptidestern leicht auftretende Bildung von 2,5-Dioxopiperazin zu vermeiden (102). Dieses H-His-Gly-OMe wird in DMF an Hämin-(API)-OH mittels Chlorameisensäureester gebunden. Gereinigt wird auf Kieselgel mit Chloroform. Erneut läßt die Ausbeute zu wünschen übrig.

Das IR-Spektrum von Hämin-(API)-His-Gly-OMe zeigt Abbildung 12. Außer der C=O-Esterbande bei 1725 cm^{-1} findet man die C=O-Schwingung der Amidbindung (Amid I) bei 1652 cm^{-1} und die Amid II-Schwingung bei 1526 cm^{-1}.

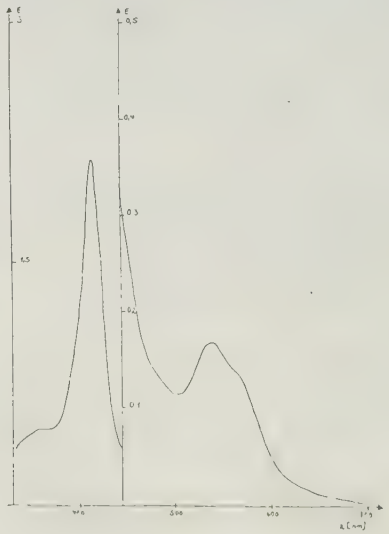
Abbildung 12: IR-Spektrum von Hämin-(API)-His-Gly-OMe



Obwohl, wie schon gesagt, die Elementaranalyse starke Abweichungen vom theoretischen Wert aufweist, kann aufgrund des höheren Stickstoffgehalts auf das Vorliegen der obigen Verbindung geschlossen werden.

Das UV-Spektrum dieser Verbindung zeigt Abbildung 13.

Abbildung 13: UV-Spektrum von Hämin-(API)-His-Gly-OMe in $CHCl_3$/MeOH 7 : 3



Es ähnelt stark dem UV-Spektrum von Hämin-diAPI, und ist somit typisch für ein low-spin Hämichromogen mit zwei starken axialen Liganden. Es beweist, daß der Imidazolstickstoff des Histidins am Eisen (III) koordiniert, obwohl bei Histidin oder histidinhaltigen Peptiden, die mit der α-Aminogruppe des Histidins an die Propionsäurereste von Eisenporphyrinen gebunden werden, wegen der kurzen Peptidkette keine so optimale Koordination am Eisen erwartet wurde (95).

2.3.5. POE_{20}-Gly-His-Hämin-API

Als Polymer, an das das Hb bzw. Mb-Modell gebunden werden soll, wurde zuerst das POE gewählt, in der Absicht, die "klassisch" synthetisierte Verbindung mit der direkt an POE synthetisierten zu vergleichen.
Wegen der geringen Ausbeute an niedermolekularem Häminprodukt war es nicht möglich, diese an weitere Polymere zu binden.

Nach der Verseifung des Methylesters des Glycins (analog 2.3.4.), wurde dessen freie Carboxylgruppe in einer Eintopfreaktion mit den OH-Gruppen des POE verestert. Kupplungsreagenz war DCCI. Es wurde analog den Vorschriften zur Veresterung von Boc-Gly mit POE nach der LPM gearbeitet.
Wie sich jedoch durch ASA ergab, lag die Beladung von POE_{20} mit Hämin-(API)-His-Gly-OH nur bei 30 %.

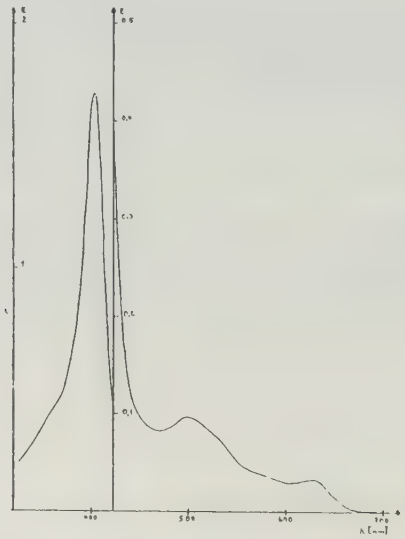
2.3.6. Hämin-(His-Gly-OMe)-OMe

Obwohl es sich, bedingt durch die unerwünschte Veresterung der zweiten freien Carboxylgruppe während der Chromatographie herausstellte, daß zur "klassischen" Synthese von Polymer-Gly-His-Hämin-API letzteres zuerst an das Hämin gebunden werden muß, wurde diese Verbindung hergestellt, um damit ein weiteres Beispiel eines fünffach koordinierten Histidin-Häminkomplexes zu erhalten. Außerdem wäre diese Verbindung nach Zugabe eines schwefelhaltigen Ligandens ein ausgezeich-

netes Modell für das Cytochrom P 450 (104, 105).
Nach Umsetzen von Hämin mit 1 Äquivalent Dipeptid wurde nach Reinigung an Aluminiumoxid mit Benzol/Methanol-Gradienten das gewünschte Produkt erhalten. Die Ausbeute an di-substituiertem Produkt war jedoch weitaus größer.

Der geringe Stickstoffanteil (gegenüber Hämin-diHisGly-OMe) in der Elementaranalyse spricht ebenso für die Monoverbindung wie das UV-Spektrum.

Abbildung 14: UV-Spektrum von Hämin-(His-Gly-OMe)-OMe ($CHCl_3$/MeOH 7 : 3)



Die Lage der Maxima (=405,500,632 nm) entspricht der Lage der Maxima von Hämin-(API)-OMe.Sie sind damit typisch für ein high-spin Fe(III) Porphyrin.

Das ^{1}H-NMR-Spektrum wird im NMR-Teil der Arbeit diskutiert.

2.4. Synthese von POE-Gly-His-Hämin-API nach der LPM

Zuordnung des ^{1}H-NMR-Spektrums von POE_{12}-Gly-His-$NH_3^+AcO^-$

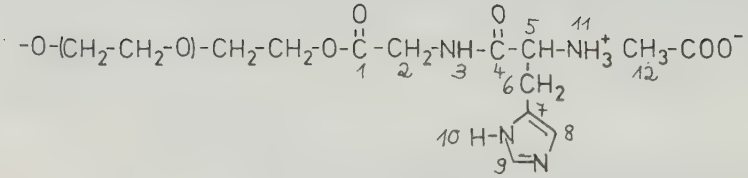
Wie aus der Problemstellung der Arbeit hervorging, sollte versucht werden, ob man am Polymer synthetisierte Hämopolymere durch ^{1}H-NMR-Spektroskopie besser charakterisieren kann, da deren Synthesen einfacher und schneller durchzuführen sind und mit besseren Ausbeuten verlaufen, ein für ihre mögliche Anwendung als Blutersatz nicht unwesentlicher Aspekt.

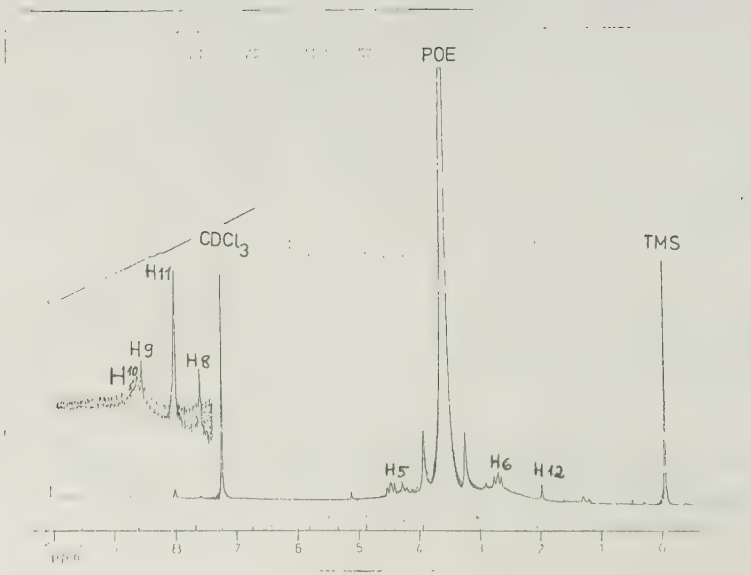
Obiges Hämopolymer wurde deshalb nach der LPM (68) in Anlehnung an (52,55) synthetisiert. Polyäthylenglykole mit der mittleren Molmasse 12 000 und 3 000 dienten als lösliche polymere Carboxylschutzgruppe. Zum Schutz der α-Aminofunktion der Aminosäuren und der sekundären Aminofunktion des Imidazols wurde die Boc-Gruppe gewählt. Die geschützten Aminosäuren wurden mit DCCI zu synthetischen Anhydriden umgesetzt und in situ nacheinander in CH_2Cl_2 gekoppelt. Kontrolliert wurden die Synthesen nach den Vorschriften der LPM. Die Abspaltung der Boc-Gruppe erfolgte in 1,2 n HCl/AcOH. Bei der Kupplung von Hämin und API wurde nach (52, 54,55) verfahren, trotz der schlechten Erfahrungen mit DCCI als Kupplungsreagenz bei den niedermolekularen Häminderivaten. Durch DCCI bedingte Nebenprodukte können bei der Synthese am Polymer leichter entfernt werden und wurden hier bisher nicht nachgewiesen.

Abbildung 15 zeigt das ^{1}H-NMR-Spektrum von POE_{12}-Gly-His-$NH_3^+AcO^-$. Durch Literaturvergleich läßt sich das Spektrum gut interpretieren (106-108).

Die schwachen Signale bei 1.3, 1.5 und 1.6 ppm können den Methylgruppen nicht vollständig abgespaltener Boc-Gruppen zugeordnet werden, während die Resonanz bei 1.4 ppm vom OH-Proton des Wassers im $CDCl_3$ stammt.

Abbildung 15: ^{1}H-NMR-Spektrum von POE_{12}-Gly-His-$NH_3^+AcO^-$ ($CDCl_3$)





Die CH_3-Gruppe der Essigsäure absorbiert bei 2 ppm, während die nicht äquivalenten Methylenprotonen des Histidins Signale bei 2,8 ppm zeigen.

Unter dem großen Peak der POE-Protonen bei 3.64 ppm liegt die Resonanz der Methylenprotonen des Glycins, während das H-Atom am α-C-Atom des Histidins eine komplizierte Feinstruktur bei 4.4 ppm aufweist.
Bei 8.6 ppm treten zwei Resonanzen auf. Das scharfe Signal kann dem H 2 Atom des Imidazols zugeordnet werden, während das breite Signal vom N-H Proton des Imidazols stammt.
Die NH_3^+-Protonen zeigen ein Signal bei 8.1 ppm, während das H 4 Atom des Imidazols sich bei 7.66 ppm zu erkennen gibt. Das Lösungsmittel absorbiert bei 7.3 ppm. Das NH-Proton der Peptidbindung ist wegen seiner Breite nicht zu erkennen. Bekanntlich erfahren NH-Protonen wegen des Kernquadrupolmoments des ^{14}N-Kerns (I=1) und Deuteriumaustausches schnellere Relaxation.

Das ^1H-NMR-Spektrum des vollständigen Hämopolymers wird im NMR-Teil diskutiert.

C. HPLC-TRENNUNG EINES REAKTIONSANSATZES

Wie sich aus dem vorigen Kapitel ergibt, werden aufgrund der langen Verweilzeit auf der Chromatographiesäule freie Carboxylgruppen des Hämins bzw. der niedermolekularen Häminderivate verestert. Ein Ausweg wäre die Verwendung nicht alkoholischer Laufmittel als polare Komponente wie DMF, Pyridin oder Essigsäure, jedoch ist die praktische Anwendung durch ihre zum Teil größere Viskosität, die die Elutionszeiten verlängert und ihre hohen Siedepunkte eingeschränkt.

Hier bietet sich die HPLC an. Aufgrund ihres Prinzips (109) sind die Trennzeiten viel kürzer und das Trennergebnis besser. Durch Einsatz von RP-Material als stationäre Phasen wäre das Problem der Veresterung durch Silanolgruppen nicht gegeben.

Die HPLC wird zwar überwiegend für analytische Zwecke eingesetzt, kann jedoch auch zu präparativen Zwecken angewandt werden (109).

Im Porphyrinbereich wurde HPLC bis jetzt überwiegend zur Trennung und zum Nachweis von Porphyrinen und ihren Estern in der klinischen Chemie eingesetzt (96, 110-118), während über Trennungen von Häminderivaten, wie sie in dieser Arbeit beschrieben werden, nichts bekannt ist. Als Probe wurde das Rohprodukt der Reaktion von Hämin und API gewählt. Als Vergleich wurde reines Hämin herangezogen.

Zunächst wurde durch analytische HPLC versucht, die günstigsten Trennbedingungen für den präparativen Einsatz zu finden. Dabei erhielt man folgende Ergebnisse:

An Kieselgelsäulen und mit CCl_4/MeOH-Gradienten konnten die verschiedenen Substanzen des Rohprodukts zwar getrennt werden, jedoch waren die Elutionsprofile bei gleichen äußeren Bedingungen (Temperatur, Säule, Flußgeschwindigkeit, Zusammen-

setzung des Elutionsmittels und Probenmenge) sehr uneinheitlich. Fast alle Peaks zeigten starkes Tailing. Oft mußte bis zu 30 Min. gewartet werden, bis die "Baseline" wieder einen geraden Verlauf zeigte. Bei der Verwendung von RP-Säulen können die meist hier verwendeten Laufmittelgemische wie Methanol/Wasser oder Acetonitril/Wasser (119) wegen der großen Tendenz der Hämine zur Aggregation (120) nicht verwendet werden. Hier werden $CHCl_3$/MeOH und CCl_4/MeOH-Gemische benützt, wobei der Methanolgehalt überwiegt.

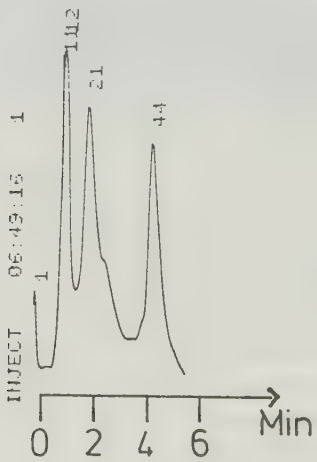
Die Ergebnisse hängen von der Länge der Trennsäule ab. Bei einer Trennsäulenlänge von 25 cm wurde starkes Tailing beobachtet, während bei einer Trennsäulenlänge von 12,5 cm kein Tailing festgestellt werden konnte. Hier konnte eine brauchbare Trennung erzielt werden. Allerdings wurde trotz Variation der mobilen Phase keine vollständige Trennung von Hämin und Hämin-diAPI erzielt. Die Reihenfolge der Substanzen ist umgekehrt wie bei polaren Adsorbenzien.

Bei RP-Material als stationärer Phase kann Tailing von freien Silanolgruppen herrühren, die bei der Herstellung der RP-Phasen von den Alkylgruppen nicht abgedeckt wurden.

Versuche, diese Trennung auf eine präparative Säule zu übertragen, scheiterten. Hier war die Trennung unvollständig. Außerdem trat, durch die größere Säulenlänge bedingt, wieder Tailing ein. Ein weiterer Nebeneffekt war, daß sich auf der Säule nach mehrmaligem Durchlauf eine Zone von irreversibel auf dem Adsorbens sitzenden Materials bildete.

Abbildung 16: Elutionsprofil der Trennung der Produkte des Reaktionsansatzes Hämin + API

1 = Hämin; 2 = Hämin-DiAPI; 3 = Hämin-(API)-OH
Säule: Nucleosil RP_{18}, 12,5 cm x 2,5 cm, Temperatur 22° C
Fluß: 1,2 ml/Min; Detektor: UV = 400 nm;
Eluent: Methanol/Chloroform;
Gradient: Linear von 70/30 bis 30/70.
Gradientenzeit: 10 Minuten.



D. NMR-UNTERSUCHUNGEN DER HÄMINVERBINDUNGEN

1. Allgemeines zur Kernresonanzspektroskopie von paramagnetischen Verbindungen

Die Theorie der Interpretation von NMR-Spektren paramagnetischer Verbindungen ist schwierig. Gegenüber der NMR normaler, diamagnetischer Verbindungen hat sie größere chemische Verschiebungen und Linienbreiten. Im folgenden soll ein kurzer Abriß über beide Einflüsse erfolgen, da sie für die Interpretation der Häminspektren wichtig sind.

1.1. Die chemische Verschiebung von paramagnetischen Substanzen (121, 122)

Zusätzlich zu dem H_o-Feld des Spektrometers erfährt der Kern die magnetischen Felder der ungepaarten Elektronen, deren Zeeman-Niveaus ebenfalls durch das H_o-Feld aufspalten. Aufgrund des weitaus höheren gyromagnetischen Verhältnisses des Elektrons gegenüber dem Kern ist der Betrag dieses Zusatzfeldes erheblich und beeinflußt als eine Art Kopplungskonstante die chemische Verschiebung jeden Kerns. Diese Kopplungskonstante ist primär richtungsabhängig. Da T_{1e} (elektronische Spin-Gitter Relaxationszeit) in den elektronischen Zeeman-Niveaus meist sehr kurz ist ($< 10^{-10}$ sec.) ist diese "Kopplungskonstante" der Erwartungswert der bei der jeweiligen Meßtemperatur thermisch besetzten elektronischen Niveaus.

Die "Kopplungskonstante" ist der Ausdruck von drei Kern-Elektron-Wechselwirkungen. Diese sind (in Operatorschreibweise):

1. Die Fermi-Wechselwirkung

$$H_F = \frac{8}{3}\pi\hbar^2 \gamma_e \gamma_n \sum_i \delta(\vec{r}_i)\vec{s}_i\vec{I} = \vec{A}_F \cdot \vec{I}$$

wobei

γ_n, γ_e die gyromagnetischen Verhältnisse des Kerns bzw. des Elektrons, $\vec{s}_i$ und $\delta(\vec{r}_i)$ der Spin Operator und die Deltafunktion des Ortsvektors $\vec{r}_i$ des Elektrons (Bezugspunkt ist der Kern) sind und $\vec{I}$ der Kernspinoperator ist.

2. Die Elektronspin-Kernspin Dipol-Dipol Wechselwirkung

$$H_D = \gamma_n \gamma_e \hbar^2 \left[\sum_i 3(\vec{r}_i \cdot \vec{s}_i)(\vec{r}_i \cdot \vec{I}) |\vec{r}_i|^{-5} - \vec{s}_i \cdot \vec{I} |\vec{r}_i|^{-3} \right] = \vec{A}_D \cdot \vec{I}$$

wobei die Bezeichnungen wie oben sind. Der geklammerte Ausdruck ist der dipolare Wechselwirkungstensor.

3. Die Elektronorbital-Kernspin Wechselwirkung

$$H_L = n\hbar\gamma_n \sum_i \vec{l}_i \cdot \vec{I} |\vec{r}_i|^{-3} = \vec{A}_L \cdot \vec{I}$$

Dies ist die Wechselwirkung des Kerns mit der Orbitalbewegung des Elektrons (gilt nur für Elektronen mit $\ell \neq 0$).

Man kann zusammenfassen und erhält

$$(\vec{A}_F + \vec{A}_D + \vec{A}_L)\vec{I} = \vec{A}_H \cdot \vec{I}$$

wobei $\vec{A}_H$ die "Kopplungskonstante" darstellt.

Daraus erhält man die richtungsabhängige paramagnetische Verschiebung, wenn $\vec{A}_H$ über alle thermisch besetzten elektronischen Niveaus gemittelt wird. Die paramagnetische Verschiebung ist definiert als die mit <u>negativem</u> Vorzeichen versehene Differenz zwischen der chemischen Verschiebung des Kerns in der paramagnetischen Verbindung ($\delta_{i\,para}$) und in der gleichen diamagnetischen Verbindung ($\delta_{i\,Dia}$).

$$\Delta\delta_i = \delta_{iPara} - \delta_{iDia} = \langle A_H \rangle \vec{K} (h\nu_0)^{-1}$$

wobei $\langle A_H \rangle$ der obige Mittelwert von A_H, ν_0 die Spektrometerfrequenz und $\vec{K}$ der Richtungsvektor des H_0 Feldes ist. $\vec{A}_H$ wird über die Zustände des Komplexes (in Dirac-Schreibweise) $|\Gamma n\rangle$ mit Hilfe des Dichtematrixformalismus berechnet (123), wobei Γ die irreduzible Darstellung des betreffenden Eigenzustandes in der Punktgruppe des Komplexes und n die "Kramers"-Entartung ist.
Man erhält folgenden komplexen Ausdruck für $\Delta\delta$

$$\Delta\delta = (kT n\nu_0 \sum_{\Gamma,n} e^{-E_\Gamma/kT})^{-1} \Big(\sum_{\Gamma n, \Gamma' m} e^{-E_\Gamma/kT} \langle \Gamma n | \vec{\mu}_e \vec{K} | \vec{H}_0 | \Gamma m \rangle \langle \Gamma m | \vec{A}_H \vec{K} | \Gamma n \rangle - \sum_{\Gamma m, \Gamma n, \Gamma' \Gamma} (E_\Gamma - E_{\Gamma'})^{-1} e^{-E_\Gamma/kT} - e^{-E_{\Gamma'}/kT}) kT \langle \Gamma n | \vec{\mu}_e \vec{K} | \vec{H}_0 | \Gamma' m \rangle \langle \Gamma' m | \vec{A}_H \vec{K} | \Gamma n \rangle \Big) \quad (1.1)$$

wobei μ_e der Operator des magnetischen Moments der Elektronen ist.

Um daraus die richtungsunabhängige (isotrope) paramagnetische Verschiebung für Moleküle in Lösung zu erhalten, muß (1.1.) über alle $\vec{K}$ gemittelt werden. Dies ist unter folgenden Voraussetzungen möglich:

$$\tau_{1e} \ll \tau_r, \quad 1/\tau_r \ll (E_{max} - E_{min})/h$$

wobei τ_r die Drehkorrelationszeit des Moleküls und $(E_{max} - E_{min})/h$ die anisotrope Energiedifferenz in Hz ist. Daraus kann man die einzelnen Beiträge von A_H zur isotropen Verschiebung $\Delta\delta_{i\,iso}$ direkt angeben.

$\Delta\delta_{i\,con}$ leitet sich von $\vec{A}_F$ her und heißt "Kontaktverschiebung". $\Delta\delta_{i\,pc}$ stammt von $(\vec{A}_D + \vec{A}_L)$ und wird "Pseudokontaktverschiebung" genannt. Diese setzt aus einem Beitrag, der von ungepaarten Elektronen am Metall ($\Delta\delta_{i\,Dip}^{M}$) und einem Beitrag der von ungepaarten Elektronen am Ligand ($\Delta\delta_{i\,Dip}^{L}$) herrührt. Letzterer spielt bei ^{1}H-NMR keine Rolle.
Setzt man in die über alle $\vec{K}$ gemittelte Gleichung (1.1) für $\vec{A}_H$ den Ausdruck für $(\vec{A}_D + \vec{A}_L)$ ein, ergibt sich der Term für $\Delta\delta_{i\,Dip}^{M}$, der durch die Diagonalkomponenten des magnetischen Suszeptibilitätstensors χ_{ii} (i = x,y,z) ausgedrückt werden kann:

$$\Delta\delta_{iDip}^{M} = R_i^{-3}\{\tfrac{1}{3}(1-3\cos^2\theta_i)[\chi_{zz}-\tfrac{1}{2}(\chi_{xx}+\chi_{yy})] + \tfrac{1}{2}\sin^2\theta_i\cos 2\Omega_i(\chi_{yy}-\chi_{xx})\} \qquad (1.2)$$

R_i ist der Abstand Metall-Kern i, θ_i der Winkel zwischen der z-Achse und dem Vektor zwischen Metall und Kern $(\vec{R}_i)$ und Ω_i der Winkel zwischen der x-Achse und der Projektion von $\vec{R}_i$ in die xy-Ebene. Die Ausdrücke, in denen R_i, θ_i und Ω_i vorkommen, werden geometrische Faktoren genannt.
Ist bei der Meßtemperatur nur ein Spinmultiplett mit der Effektivspinquantenzahl S' thermisch besetzt, so kann $\Delta\delta_{i\,Dip}^{M}$ über die ESR g-Faktoren ausgedrückt werden.

$$\Delta\delta_{iDip}^{M} = (n^2S'(S'+1)9kTR_i^3)^{-1}\{[g_{zz}^2-\tfrac{1}{2}(g_{xx}^2+g_{yy}^2)](1-3\cos^2\theta_i) + \tfrac{3}{2}(g_{yy}^2-g_{xx}^2)\sin^2\theta_i\cos 2\Omega_i\} \qquad (1.3)$$

K ist die Bolzmannkonstante, T die absolte Temperatur.

Setzt man für $\vec{A}_H$ den Ausdruck für $\vec{A}_F$ in (1.1.) (über alle $\vec{K}$ gemittelt) ein, so erhält man, unter der Voraussetzung, daß wieder nur ein Spinmultiplett besetzt ist und unter Verwendung eines durchschnittlichen g-Faktors $\bar{g}$

$$\Delta\delta_{icon} = (3kT\gamma_n)^{-1} A_i \bar{g}_n S(S+1) \qquad (1.4)$$

A_i ist die Kontaktverschiebungskonstante in Hz.
Über A kann Auskunft über die Kovalenz von Metall-Ligand Bindungen erhalten werden, da sie das Ausmaß der direkten Spinlokalisation am Ort des Kerns über die MO'S des Komplexes widerspiegelt:

Wird der Spin in ein über den Liganden delokalisiertes π-MO transformiert, so erhält man über die Mc-Connell Gleichung bei ^1H als Kern (124)

$$A^H_{C-H} = (2S)^{-1} Q_{C-H} \rho^{\pi}_C \qquad (1.5) \quad (Q_{C-H} = -63 \text{ Mhz})$$

Information über die Spindichte ρ^{π}_C am aromatischen Kohlenstoffatom, an dem das betreffende H-Atom gebunden ist.
Ist eine Methylgruppe am betreffenden C-Atom gebunden, so lautet die entsprechende Gleichung (125)

$$A = (2S)^{-1} (B_0 + B_1 \cos^2 \varphi) \rho^{\pi}_C \qquad (1.6)$$

φ ist der Winkel zwischen der C-C-H Ebene und der p_z-Achse des aromatischen Kohlenstoffs (bei frei drehbaren Methyl- oder Methylengruppen wird mit dem Mittelwert von $\cos^2 \varphi$ gerechnet).
Aus diesen Betrachtungen folgt, daß bei Beteiligung von π-MO'S an der Spindelokalisation $A^H_{CH_3}$ und A^H_{C-H} (und damit $\Delta \delta_{icon}$) entgegengesetzte Vorzeichen haben.
Wird der Spin in ein Q-MO transferiert, so ist A immer positiv und nimmt mit wachsender Entfernung vom Metall ab (126).

1.2. Die Linienbreite von NMR-Spektren paramagnetischer Verbindungen (127)

Zusätzlich zum großen Verschiebungsbereich ist das NMR-Spektrum paramagnetischer Verbindungen durch größere Linienbreiten gekennzeichnet. Diese Linienverbreiterung hat ihre Ursache in den schnelleren Relaxationsprozessen der Kerne durch die ungepaarten Elektronen.
Da die Linienbreite (in Hz) proportional zu $1/T_{2n}$ ist, wobei T_{2n} die Kern Spin-Spin Relaxationszeit ist, sollen die Faktoren, die T_{2n} beeinflussen, kurz umrissen werden. Die Relaxationszeiten werden wie bei den isotropen Verschiebungen von den dipolaren und Kontakt Wechselwirkungen bestimmt.

Ist $\omega_s^2\tau_c^2 \,/\, \omega_s^2\tau_e^2 << 1$ ("fast motion limit"), so gelten folgende Ausdrücke für $1/T_{2n}$ bzw. $1/T_{1n}$ (128,129):

$$(T_{2n})^{-1} = (T_{1n})^{-1} = \frac{4}{3}[S(S+1)g^2\beta^2\gamma_I^2R^{-6}]\tau_c + \frac{2}{3}S(S+1)A^2\hbar^{-2}\tau_e \qquad (2.1)$$

wobei ω_s die Resonanzfrequenz des Elektrons, S die Spinquantenzahl, R der Kern-Metallabstand und mit einem durchschnittlichen g Faktor gerechnet wird (da die Gleichung sonst komplizierter wird).
τ_c die dipolare Korrelationszeit, und τ_e die Austauschkorrelationszeit sind wie folgt definiert:

$$\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{\tau_r} + \frac{1}{T_{1e}} \qquad \frac{1}{\tau_e} = \frac{1}{\tau_{ex}} + \frac{1}{T_{2e}}$$

T_{1e} und τ_r sind wie in 1.1 definiert, T_{2e} ist die elektronische Spin-Spin Relaxationszeit und $1/T_{ex}$ ist chemische Austauschgeschwindigkeit. Die anderen Bezeichnungen entsprechen denen von 1.1.
Ist A nicht allzu groß, so wird $1/T_{2n}$ hauptsächlich vom ersten Term in Gleichung(2.1.) beeinflußt, und da im allge-

meinen $T_{1e} \ll \tau_r$ hängt die Linienbreite und damit die Auflösung der NMR-Spektren paramagnetischer Verbindungen hauptsächlich vom T_{1e} ab, dessen Größe wiederum von der magnetischen Anisotropie des Komplexes beeinflußt wird, den gleichen Faktoren die für $\Delta \delta_i^{M}{}_{Dip}$ maßgebend sind (130-132).

Paramagnetische Substanzen, bei denen T_{1e} relativ lang ist ($> 10^{-8}$ sec), liefern bei RT in der Regel gute ESR-Spektren, aber keine NMR-Spektren, während Substanzen, bei denen T_{1e} kurz ist ($T_{1e} < 10^{-10}$ sec), sodaß ESR-Spektren nur bei sehr tiefen Temperaturen möglich sind, in der Regel gute NMR-Spektren bei RT liefern.

2. Diskussion und Zuordnung der NMR-Spektren der Häminverbindungen

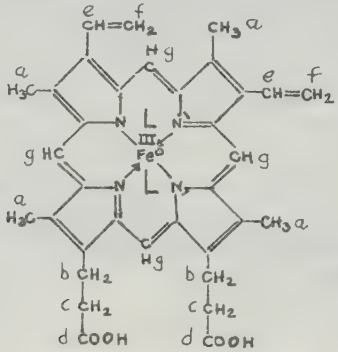
Vorbemerkung: Obwohl die Linienbreiten und die isotropen Verschiebungen temperaturabhängig sind, wurden die Spektren nur bei einer Temperatur (27° C) aufgenommen. Wegen des Modellcharakters dieser Verbindungen sollten die NMR-Spektren möglichst in der Nähe der physiologischen Temperatur (37° C) gemessen werden. Außerdem ist die Löslichkeit dieser Verbindungen in den Temperaturbereichen, wo über die Temperaturabhängigkeit der isotropen Verschiebungen zusätzliche Aussagen gemacht werden können (-50° C bis -100° C) in den meisten NMR-Lösungsmitteln herabgesetzt, sodaß zu viel Meßzeit beansprucht worden wäre.

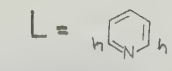
2.1. Die Diskussion und Zuordnung der ^{1}H-NMR-Spektren von Hämin in Pyridin-d_5 und DMF-d_7

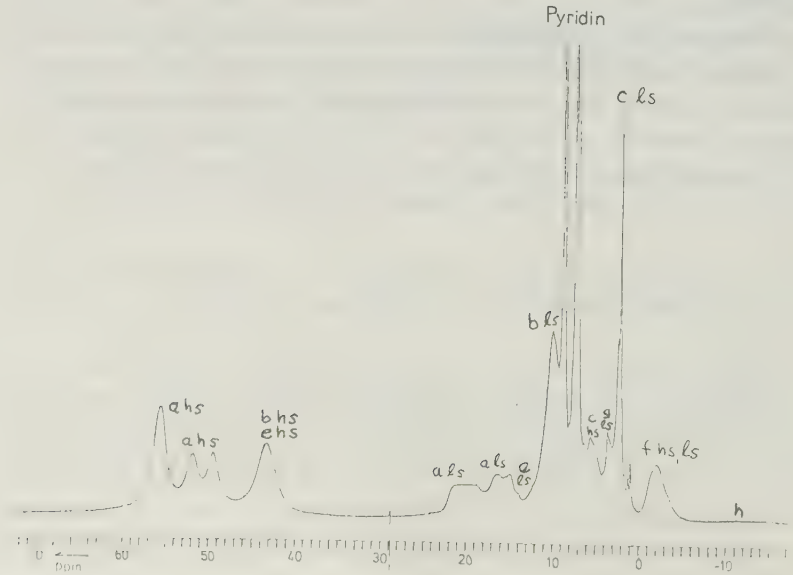
Abbildung 17 zeigt das Spektrur von Hämin in Pyridin-d_5. Die Zurodnung der Resonanzen zu den Protonen des Hämins, und den Protonen des koordinierten Pyridins erfolgte nach den Kriterien von Abschnitt 1.1 und Abschnitt 1.2, sowie nach Literaturdaten (133-140).

Abbildung 17: ^{1}H-NMR-Spektrum von Hämin in Pyridin -d_5, Standard Pyridin bei 27° C

hs = Proton der high-spin Form von Hämin $(Pyr)_2^+$
ls = Proton der low-spin Form von Hämin $(Pyr)_2^+$







Es existiert bei RT ein high-spin-low-spin Gleichgewicht, sodaß sowohl die Signale für den high-spin Komplex wie für den low-spin Komplex zu sehen sind (134,135).

$$\text{Hämin } (Pyr)_2^+ \rightleftharpoons \text{Hämin } (Pyr)_2^+$$

$S = 1/2$ $\qquad$ $S = 3/2;\ S = 5/2$ $\qquad$ Pyr = Pyridin

Das Auftreten getrennter Signale für die high-spin und die low-spin Form von Hämin $(Pyr)_2^+$ beweist, daß die Austauschgeschwindigkeit zwischen der Low-Spin Form und der high-spin Form langsamer ist als der Frequenzunterschied zwischen den jeweiligen Resonanzfrequenzen.

Diskutiert wird noch, ob (135,139) die high-spin Signale von $S = 3/2$ oder $S = 5/2$ herrühren.
Dem high-spin - low-spin Gleichgewicht überlagert ist ein Austausch zwischen komplexierten und nicht komplexierten Pyridinmolekülen, was zusätzliche Linienverbreiterung und Koaleszensphänomene bei den low-spin Methylresonanzen des Hämins bewirkt, die bei anderen low-spin Häminen (wie z.B. Hämin $(CN)_2^-$) bei RT (141) aufgelöst sind.
Generell haben die Protonen der low-spin Form kleiner isotrope Verschiebungen und die Signale zeigen kleinere Linienbreiten als die der high-spin Form, wie aus den Gleichungen des vorigen Kapitels abgeleitet werden kann. Bei der high-spin Form sind die Linienbreiten so groß, daß Signale zusammenfallen, oder wie die Resonanzen der meso-Protonen nicht zu sehen sind. In der folgenden Diskussion werden anhand der Häminresonanzen im Spektrum von Hämin $(Pyr)_2^+$ generelle Angaben über die Art der paramagnetischen Verschiebung, die Ermittlung ihrer Beiträge und den sich daraus ergebenden Schlüssen gemacht, welche allgemein für die high-spin und low-spin Form bei den hier vorliegenden Häminkomplexen gelten.
Bei natürlichen Porphyrinen, wie Hämin und den hier synthetisierten Häminderivaten ist die Trennung der Beiträge

zur isotropen Verschiebung weitaus schwieriger als bei Porphyrinen von TPP Charakter, wo die Phenylprotonen überwiegend dipolare Verschiebung erfahren (142-145).

Da bis jetzt keine magnetischen Messungen in Einkristallen zur Ermittlung des magnetischen Suszeptibilitätstensors vorliegen, und wegen des schlechten Kristallisationsvermögens der natürlichen Hämine wahrscheinlich undurchführbar sind, ist man bei diesen Substanzen zur Abschätzung der dipolaren Beiträge auf Gleichung (1.2$\overset{3}{2}$) (siehe Kapitel 1.1) angewiesen, wobei axiale Symmetrie $g_z = g_\parallel$, $g_\perp^2 = (g_x^2 + g_y^2)/2$ angenommen und mit den bei sehr tiefer Temperatur gemessenen g-Werten gerechnet wird. Jedoch ist diese Vorgehensweise oft problematisch (146).

Bei low-spin Häminen ist $g_z > g_\perp$ (147) und die geometrischen Faktoren der Häminprotonen sind positiv. Deshalb ist $\Delta \delta_{i\ Dip}^{M}$ bei allen diesen Protonen positiv. Da die CH_3 Protonen, die α-CH_2-Protonen der Propionsäurereste und die α-Vinyl-Protonen insgesamt negative isotrope Verschiebungen aufzeigen, müssen diese erhebliche negative Kontaktverschiebungen aufweisen, während die meso-Protonen kaum Kontaktverschiebungen zeigen.
Da bei low-spin Fe(III)-Porphyrinen die MO'S des Porphyrinsystems zur Spindellokalisation herangezogen werden (148), kann mit Gl. (1.4) und (1.6) auf positive Spindichte an den β-C-Atomen der Pyrrolringe geschlossen werden, während die meso-C Atome so gut wie keine Spindichte aufweisen. Daraus kann abgeleitet werden, welche Orbitale sich an der Metall-Porphyrin Bindung beteiligen, was aber nicht weiter diskutiert werden soll. High- spin Hämine sollten wegen ihres ^6A Grundzustandes keine g-Anisotropie zeigen. Diese kommt jedoch hier durch die "O-Feld-Aufspaltung" der Spindubletts ($\pm$ 1/2, $\pm$ 3/2 und $\pm$ 5/2) mit angeregten höheren Zuständen zustande (149). Das quantitative Maß dafür ist der O-Feld-Aufspaltungsparameter D. Rückt man die g-Werte in Gl. (1.3)

2.2. Diskussion und Zuordnung der NMR-Spektren der synthetisierten niedermolekularen Häminverbindungen

Die Zuordnung der NMR-Resonanzen zu den Protonen der synthetischen Häminverbindungen ist wegen der kovalenten Bindung der Liganden weitaus schwieriger als wenn die Liganden extern zugegeben worden wären. Wie schon erwähnt, treten bei den monosubstituierten Häminen Bindungsisomere auf, die nicht getrennt werden können, sodaß das Spektrum eine Überlagerung der Spektren beider Isomere darstellt. Weiterhin kommen Koordinationsisomere vor, da diese Verbindungen gegenüber Drehung um 180° um die Achse, die durch die α- und γ-Methinprotonen geht, inäquivalent sind. Außerdem erscheinen wegen der Ausdehnung des Spektralbereichs auf 12000 Hz zahlreiche Peaks, die auf Geräteartefakte zurückzuführen sind. Generell erfolgte die Zuordnung der Protonen zu den NMR-Resonanzen nach den Kriterien des Abschnitts 1.1 und 1.2, nach Literaturdaten von verschiedenen Fe(III)-Porphyrinen mit extern zugegebenen Liganden (151-156) und Annahmen über die Geometrie des Komplexes.

2.2.1. Diskussion des ^{1}H-NMR-Spektrums von Hämin-[API]-OMe

Auffallend im Spektrum (Abb. 19) ist der Intensitätsunterschied zwischen den Signalen im normalen diamagnetischen Verschiebungsbereich (0-10 ppm) und im paramagnetischen Verschiebungsbereich. Insgesamt sind die Linien sehr breit, was auf das Vorliegen eines high-spin Komplexes schließen läßt. Die breiten unaufgelösten Signale bei ~ 55 ppm, die wie bei Hämin in DMF den Methyl, α-Vinyl und den α-Methylenprotonen des Hämins zugeordnet werden können, untermauern dies ebenso wie die Resonanzen bei -1 bis -4 ppm, bei denen die β-Vinylprotonen des Hämins absorbieren.
Die vom paramagnetischen Zentrum weiter entfernten Protonen, wie die β-Methylenprotonen des Hämins, die Methylesterprotonen sowie die Protonen H 1 und H 2 sollten in der Nähe

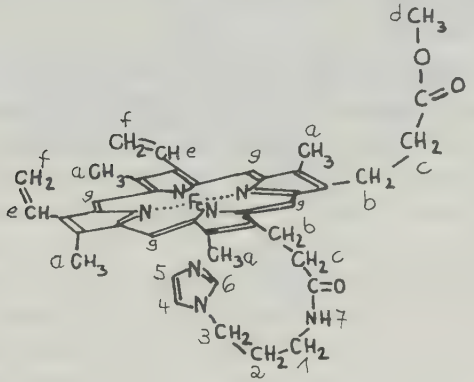
ihrer diamagnetischen Werte absorbieren, wobei der anisotrope Ringstromeffekt noch zu berücksichtigen ist. Entsprechend diesen Überlegungen wurden sie auch zugeordnet. Die H 2 Protonen sind unter einer starken Resonanz bei $\sim$ 1,5 ppm verborgen, die von einer TMS Verunreinigung stammt. Folgende Überlegungen führten zur Zuordnung der Imidazolprotonen.

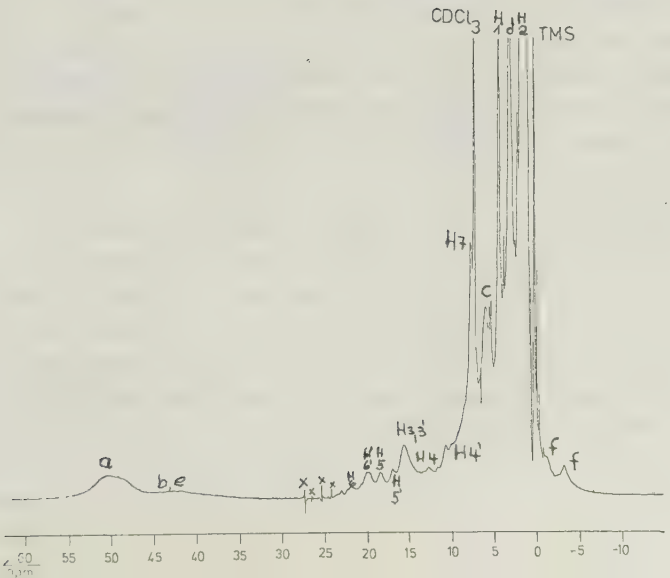
Die geometrischen Faktoren der Imidazolprotonen sind bei high-spin Häminen unbekannt, doch ist hier der dipolare Anteil an der Verschiebung gering (120). High-spin Hämine haben die d-Elektronen Konfiguration $(d_{xy})^1(d_{xz})^1(d_{yz})^1(d_{x^2-y^2})^1(d_{z^2})^1$.

Bei ihnen überwiegt die Kontaktverschiebung, die, wie schon erwähnt, durch Spintransfer in das Q-Orbitalgerüst der Liganden zustande kommt, mit wachsender Entfernung zum Metall abnimmt und immer negativ ist. Danach müssten die Imidazolprotonen H 5 und H 6 die stärkste paramagnetische Verschiebung erfahren, gefolgt vom H 4 Proton und den beiden H 3 Protonen. Dabei treten pro Imidazolproton zwei Resonanzen auf, die dadurch bedingt sind, daß es sich bei dieser Substanz um zwei Bindungsisomere handelt, deren Resonanzen in diesem Verschiebungsbereich getrennt absorbieren.

Abbildung 19: ^{1}H-NMR-Spektrum von Hämin-(API)-OMe in $CDCl_3$ bei 27° C
Standard TMS x = Artefakt peak.

Die Resonanzen des anderen Isomeren bei den Imidazolprotonen sind gestrichelt.





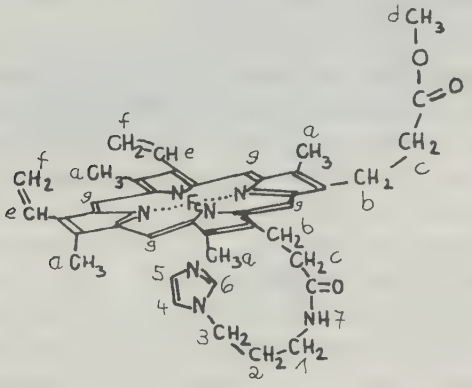
ihrer diamagnetischen Werte absorbieren, wobei der anisotrope Ringstromeffekt noch zu berücksichtigen ist. Entsprechend diesen Überlegungen wurden sie auch zugeordnet. Die H 2 Protonen sind unter einer starken Resonanz bei $\sim$1,5 ppm verborgen, die von einer TMS Verunreinigung stammt. Folgende Überlegungen führten zur Zuordnung der Imidazolprotonen.

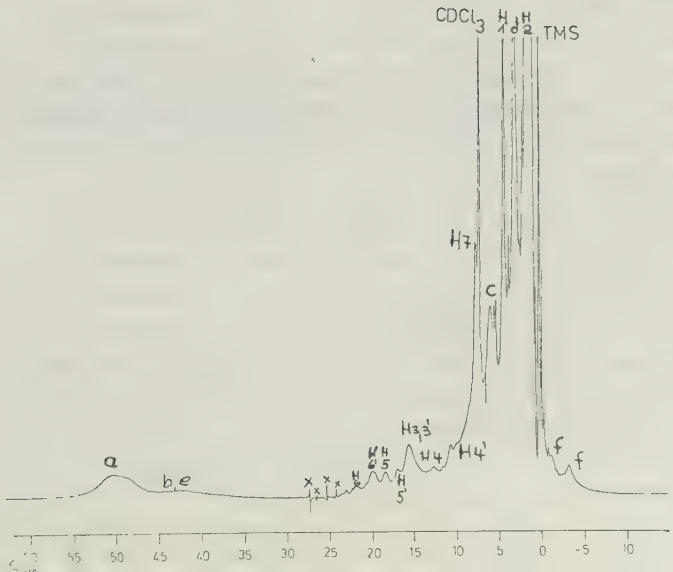
Die geometrischen Faktoren der Imidazolprotonen sind bei high-spin Häminen unbekannt, doch ist hier der dipolare Anteil an der Verschiebung gering (120). High-spin Hämine haben die d-Elektronen Konfiguration $(d_{xy})^1(d_{xz})^1(d_{yz})^1(d_{x^2-y^2})^1(d_{z^2})^1$.

Bei ihnen überwiegt die Kontaktverschiebung, die, wie schon erwähnt, durch Spintransfer in das Q-Orbitalgerüst der Liganden zustande kommt, mit wachsender Entfernung zum Metall abnimmt und immer negativ ist. Danach müssten die Imidazolprotonen H 5 und H 6 die stärkste paramagnetische Verschiebung erfahren, gefolgt vom H 4 Proton und den beiden H 3 Protonen. Dabei treten pro Imidazolproton zwei Resonanzen auf, die dadurch bedingt sind, daß es sich bei dieser Substanz um zwei Bindungsisomere handelt, deren Resonanzen in diesem Verschiebungsbereich getrennt absorbieren.

Abbildung 19: ^{1}H-NMR-Spektrum von Hämin-(API)-OMe in $CDCl_3$ bei 27° C
Standard TMS x = Artefakt peak.

Die Resonanzen des anderen Isomeren bei den Imidazolprotonen sind gestrichelt.





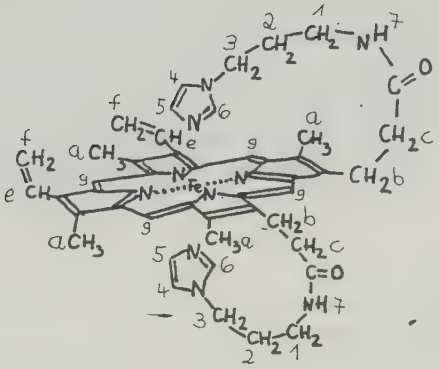
2.2.2. Diskussion und Zuordnung des ^{1}H-NMR-Spektrums von Hämin-diAPI

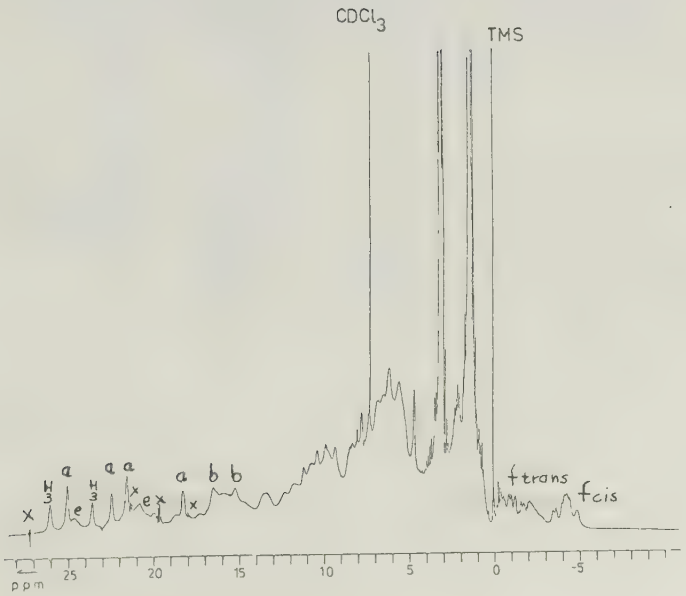
Wegen der geringen Linienverbreiterung und den kleineren isotropen Verschiebungen kann auf einen low-spin Fe(III) Häminkomplex geschlossen werden, bei dem beide Imidazole des API'S am Eisen koordinieren, wie das auch bei Hämin mit freiem Imidazol der Fall ist.

Gegenüber einem Spektrum von Hämin$(Im)_2^+$ (155) zeichnet es sich durch größere isotrope Verschiebungen (bei Hämin $(Im)_2^+$ ist die tiefstfeldverschobene Resonanz bei +17 ppm zu finden) und zahlreiche Linien aus. Die größere Zahl der Resonanzen kann nicht allein durch das Hinzufügen der beiden Aminopropylreste am Imidazol erklärt werden. Wegen ihrer (gegenüber freien Imidazolliganden) eingeschränkten Drehbarkeit ordnen sich möglicherweise die π-Ebenen der API Imidazole gegenüber der Hämin-Ebene in besonderer Weise an und erzeugen zusätzliche Inäquivalenz in der Umgebung der Protonen. Solche verschiedenen Hämin-Imidazolorientierungen wurden beim Cytochrom b_5 gefunden (157), für das das Hämin-diAPI ein Modell ist. Das gleiche müßte auch beim Hämin-(API)-OMe zu beobachten sein, jedoch ist die Linienbreite dort größer und die Beiträge zur isotropen Verschiebung anders als in einem low-spin Häminkomplex. Auf Grund der zahlreichen Linien können keine Einzelzuordnungen vorgenommen werden, sondern es werden nur charakteristische Gruppen herausgegriffen.

Am leichtesten läßt sich die Gruppe zwischen 26 ppm und 18 ppm interpretieren. Die Signale der Methylprotonen des Hämins sind hier deutlich zu sehen wie der α -Vinylprotonen, die immer in Begleitung der Methylsignale erscheinen (141, 152). In diesem Bereich absorbieren auch die H 3 Protonen, wie sich durch Vergleich mit dem CH_3-Signal des N-Methyl-Imidazols (143,151,155) ergibt.

Abbildung 20: ^{1}H-NMR-Spektrum von Hämin-diAPI in $CDCl_3$
bei 27° C
Referenz TMS x = Geräteartefakt





Beihöchstem Feld liegen die Signale der ß-Vinylprotonen, wobei die zum α Vinylproton trans- bzw. cis-ständigen Vinylprotonen getrennt absorbieren, wie das bei den Dicyano low-spin Häminen der Fall ist (141). Bei 15 ppm bis 14 ppm absorbieren die α-Methylenprotonen des Hämins, da deren Abstand zu den Methylprotonen im einfachen low-spin Fe(III) Häminkomplex etwa 10 ppm beträgt. Verborgen unter den zwei großen Peaks bei 3 bzw. 1,4 ppm, die von nicht vollständig abgetrenntem Triäthylaminhydrochlorid herrühren (im DC nicht zu erkennen), liegen die Signale der Mesoprotonen, die bei low-spin Häminen in diesem Bereich absorbieren (155).
Die Resonanzen der am weitesten vom paramagnetischen Zentrum entfernten Protonen erscheinen im Bereich 2 ppm - 7 ppm, können jedoch einzeln nicht zugeordnet werden. Ebenso ist der Ursprung der Resonanzen zwischen 13 ppm und 7 ppm unklar.
Nach (155) sollen bei natürlichen Häminen mit extern zugegebenem 1-Methyl-Imidazol die Resonanzen der Imidazolprotonen bei -6 ppm (Proton H 5), + 8,9 ppm (Proton H 6) und + 7,3 ppm (Proton H 4) liegen und wegen der Nähe zum Eisen verbreitert sein (R^{-6} Term in (2.1)). Entsprechende Signale im Spektrum kommen zwar in den genannten Bereichen vor, doch spricht ihre geringe Breite dagegen.
Bei Fe(III) $TPP(Im)_2$, wo die Trennung der dipolaren Verschiebung von den Kontaktverschiebungen möglich ist, soll beim Imidazol, Spin-Transfer via π-Orbitale vom Eisen in das niedrigste, unbesetzte π^*-Orbital des Imidazols für die Kontaktverschiebung verantwortlich sein (143).

2.2.3. Diskussion des NMR-Spektrums von Hämin-(His-Gly-OMe)-OMe

In Abbildung 21 a und b läßt die geringe Linienbreite des Spektrums auf das Vorliegen eines low-spin Komplexes bei Hämin-(His-GlyOMe)OMe schließen, was überraschend ist, da das UV-Spektrum dieser Verbindung (Abb. 14) für das Vorliegen eines high-spin Komplexes spricht.

Abbildung 21: ^{1}H-NMR-Spektrum von Hämin-(His-Gly-OMe)-OMe in DMSO-d_6 bei 27° C

a) Gesamtansicht

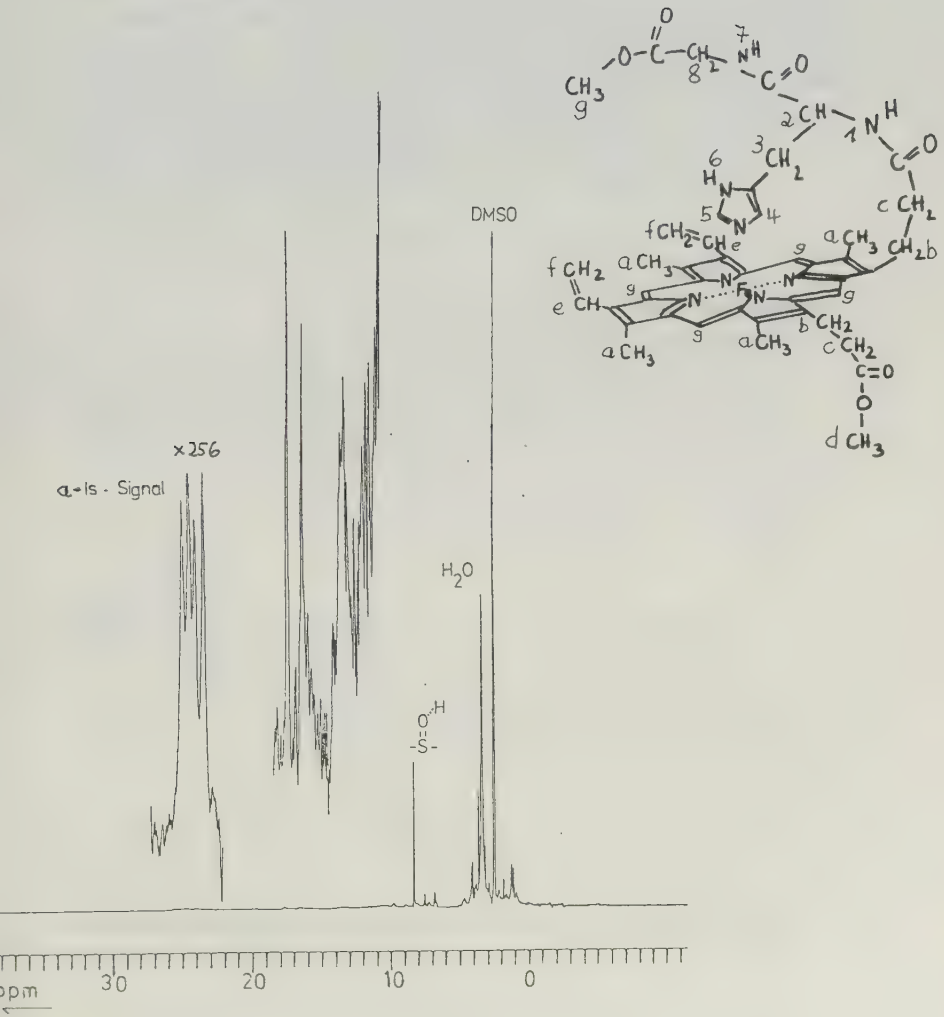
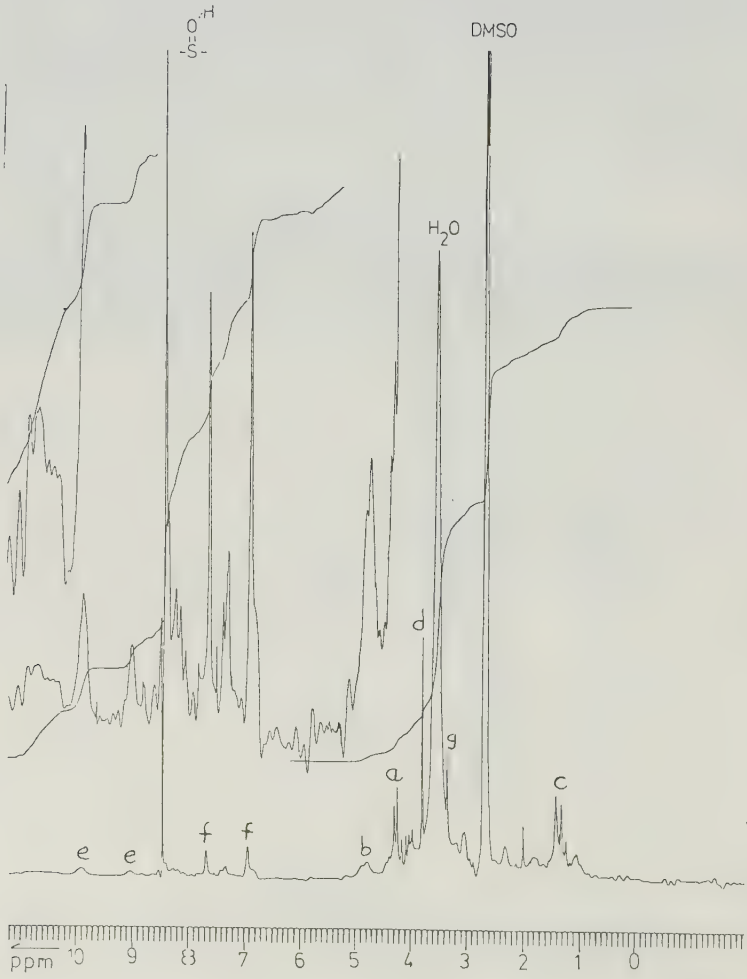


Abbildung 21

b) Bereich 0 - 10 ppm, gespreizt

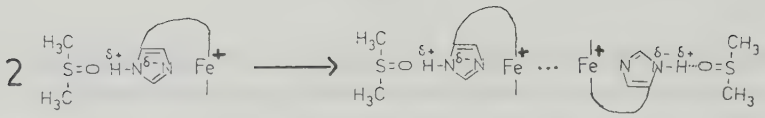


Die sehr schwache Ausprägung der für low-spin Hämin charakteristischen Signale der Methylgruppen des Hämins bei ~26 ppm (siehe Spektrum Hämin-diAPI) sowie das Fehlen von Resonanzen im negativen Verschiebungsbereich, die für die ß-Vinylprotonen sowohl der high-spin wie der low-spin Form von Hämin verantwortlich sind, deuten darauf hin, daß hier zusätzlich ein antiferromagnetischer Spinausgleich zwischen zwei Molekülen dieses Komplexes stattfindet. Antiferromagnetische Kopplung kommt bei μ-oxo Fe(III) Porphyrinen vor, deren ^{1}H-NMR-Spektren sich durch schmale Linienbreiten und geringe isotrope Verschiebungen auszeichnen (158,159).

Im Folgenden soll eine Deutung darüber gegeben werden, warum dieser Komplex, der nur einen Imidazolliganden pro Hämin aufweist und deshalb wie Hämin-(API)-OMe ein high-spin Spektrum liefern sollte, sich hier ganz anders verhält.

In einer Serie von Versuchen (160) wurden charakteristische Unterschiede zwischen freiem Imidazol und N-alkylierten Imidazolen festgestellt, die auf die N-H Bindung des freien Imidazols zurückgeführt werden. So soll auch die N-H-Gruppe beim proximalen Histidin über Wasserstoffbrückenbindung zur Proteinmatrix beim kooperativen Effekt des Hb's beteiligt sein (161).
DMSO ist ein exzellenter Protonenakzeptor, aber kein Protonendonator.

Es ist durchaus denkbar, daß durch H-Brückenbindung zwischen dem DMSO des Lösungsmittels und dem koordinierten Imidazol eine vom Ausmaß der Brückenbildung negative Teilladung im Imidazolring geschaffen wird (162), die ein ausreichend hohes Ligandenfeld liefert, daß das Fe^{3+} von der high-spin Form in die low-spin Form übergeht. Der antiferromagnetische Spinausgleich könnte durch Dimerisierung von zwei Komplexen und nach dem Schema

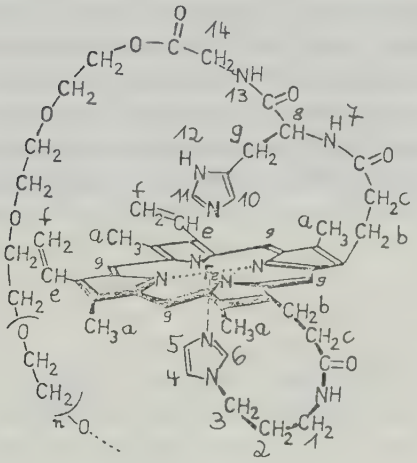


geschehen, wobei die Annäherung durch die verminderte, positive Ladung am Eisen und die bei der Aufnahme von NMR Spektren üblichen höheren Konzentration begünstigt wird. Zur Beschreibung der isotropen Verschiebungen sind andere Gleichungen als (1.2), (1.3) oder (1.4) erforderlich (163). Außerdem ist die genaue Geometrie des Komplexes unbekannt. Aus diesen Gründen wurde auf eine detaillierte Zuordnung in diesem Spektrum verzichtet und nur die Protonen des Hämins nach Literaturdaten zum μ-oxo Dimeren von Hämin zugeorndet (158).

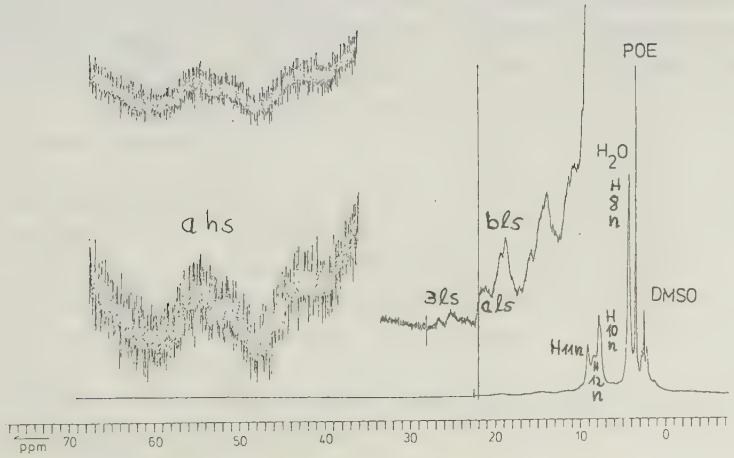
2.3.1. Diskussion des ^{1}H-NMR-Spektrums von POE_3-Gly-His-Hämin-API

Während die Signale im normalen Verschiebungsbereich gut zu erkennen sind, und der unkomplexierten Dipeptidkomponente am Hämopolymer zugeorndet werden können, weisen die Resonanzen im Tieffeldverschiebungsbereich ein schlechteres Signal zu Rauschverhältnis auf. Dies läßt auf eine zu geringe Beladung der Dipeptidkomponente mit Hämin (und API) schliessen (164). Die breiten und nur bei hoher Verstärkung sichtbaren Resonanzen sind für die Methylgruppen von high-spin Hämin verantwortlich, während die Signale bei 26 ppm (wie bei Hämin-di-API) für die Methylgruppen des Hämins in der low-spin Form charakteristisch sind.
Dies bedeutet, daß diese Verbindung bei RT nebeneinander in einer high-spin Form, wo der Imidazolrest des Histidins nicht am Eisen koordiniert, und einer low-spin Form vorkommt, wo beide Imidazole koordinieren. Da die low-spin Form stärkere Signalintensitäten aufweist, herrscht diese Form bei RT vor, wie auch aus dem UV-Spektrum von Hämin-API-His-Gly-OMe hervorgeht.

Abbildung 22: ^{1}H-NMR-Spektrum von POE_3-Gly-His-Hämin-API
in DMSO-d_6
Standard DMSO-d_6 bei 27° C



n = nicht komplexiert



Die gegenüber einer normalen low-spin Häminverbindung größere Linienbreite kann auf die hohe Viskosität der Lösung zurückgeführt werden, die über eine Erhöhung von τ_r zu einer Abnahme von T_{1n} führt.
Wegen des schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses und der Möglichkeit, daß sich auch hier wie beim Hämin-diAPI die Imidazolebenen in Bezug auf die Häminebene besonders anordnen ist eine definierte Zuordnung der einzelnen Signale nicht möglich. Nur die charakteristischen Resonanzen im Tieffeldbereich und die Signale der unkomplexierten Dipeptidkomponente könnten angegeben werden.

2.3.2. Diskussionen des ^{13}C-NMR-Spektrums von POE_3-Gly-his-Hämin-API

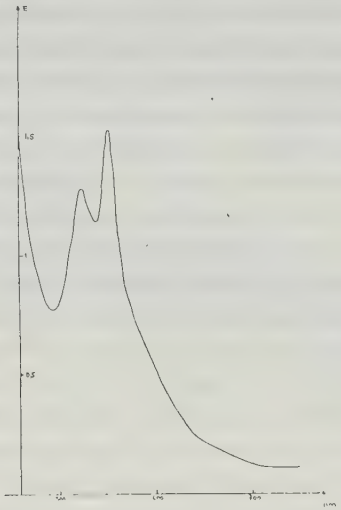
Zusätzlich zum ^{1}H-NMR-Spektrum wurde von dieser Verbindung ein ^{13}C-NMR-Spektrum angefertigt. Trotz langer Meßzeit (705000 scans) konnten nur die Resonanzen der nicht komplexierten Peptidkomponente eindeutig erkannt werden.
Die restlichen, sehr schwachen Signale konnten durch Literaturvergleich mit einem ^{13}C-Spektrum von Hämin-$(Im)_2^+$ (165) den Vinylkohlenstoffatomen und den ß-Methylenkohlenstoffatomen des Hämins und den Kohlenstoffatomen von komplexiertem Imidazol zugeordnet werden. Die übrigen Resonanzen konnten wegen der schlechten Beladung des Polymers nicht detektiert werden.

E. UNTERSUCHUNG DER REVERSIBLEN OXYGENIERUNG VON POE_{12}-Gly-His-Hämin-API IM FESTZUSTAND

In der Einleitung dieser Arbeit wurde erwähnt, daß eine Maßnahme, die die Oxidation von Fe(II)-Porphyrinen über den dimeren Mechanismus verhindern kann, darin besteht, die Porphyrine an feste Oberflächen zu binden um ihre Beweglichkeit einzuschränken. Nach diesem Immobilisierungskonzept haben schon einige Arbeitsgruppen (36,37,166) die Oxygenierung im Festzustand bei hohen Sauerstoffpartialdrücken (reiner Sauerstoff oder Sauerstoff bei Atmosphärendruck) oder tiefen Temperaturen untersucht. Deoxygeniert wurde entweder mit Stickstoff, durch Anlegen von Vakuum oder durch Erhitzen auf höhere Temperaturen. Über Oxygenierungsversuche im Festzustand bei Partialdrücken, die dem Halbsättigungsdruck von Oxy-Mb und Oxy-Hb im R-Zustand (0,55 Torr) entsprechen, wurde nur einmal bei einem Fe(II) Porphyrinkomplex berichtet (167), jedoch wurde der gebundene Sauerstoff direkt nicht nachgewiesen.
Das Oxygenierungsverhalten des obigen Komplexes ist in wässriger Lösungs mittels UV-Spektroskopie untersucht worden. Obwohl die erhaltenen spektralen Änderungen auf eine reversible Oxygenierung hinweisen, wäre es wünschenswert, den reversibel gebundenen Sauerstoff direkt nachzuweisen. Da dies in Lösung sehr schwierig ist, soll dies im Festzustand untersucht werden, als Ergänzung zu den Messungen in Lösung. Der freigelassene Sauerstoff sollte mittels GC nachgewiesen werden.

Da in den synthetisierten Hämopolymeren das Eisen im 3-wertigen Zustand vorliegt, muß es zunächst reduziert werden. Hierzu wurde es in bidestilliertem Wasser mit einem Überschuß an $Na_2S_2O_4$ reduziert und das überschüssige $Na_2S_2O_4$ durch anaerobe Säulenchromatographie (Sephadex G 25) entfernt (siehe experimenteller Teil).
Nach Auffangen der Lösung in dem Spezialgefäß wurde das Absorptionsspektrum im sichtbaren Bereich vermessen.

Abbildung 22: UV-Spektrum von POE_{12}-Gly-His-Hämin-API im sichtbaren Bereich (in bidestilliertem Wasser)



Die Lage der Bandenmaxima (524, 552 nm) ist typisch für Fe(II)-Hämin mit zwei axialen Imidazolliganden (168). Die Lösung wird dann gefriergetrocknet.

Meßprinzip:
Das Oxygenierungsverhalten dieses Feststoffs wird in einem Gasgemisch untersucht, das aus 0,3 % Sauerstoff in Helium besteht ($P_{O2}^{\frac{1}{2}}$ 2,2 Torr bei Atmosphärendruck). Dabei wird nicht das ganze Volumen (50 ml) der Küvette untersucht, sondern es wird mit einer gasdichten Spritze, die mit einem Spezialverschluß versehen ist, ein Probevolumen von 5 ml entnommen und dieses mittels GC mit reinem Helium als Trägergas analysiert. Die Trennsäule ist eine Molekularsiebsäule, die Sauerstoff und Stickstoff voneinander trennt und bei 30° C betrieben wird.

Da das Probevolumen klein gegenüber dem Küvettenvolumen ist, wird während der Probeentnahme das Gasgleichgewicht zwischen Feststoff und dem darüber liegenden Gasraum vernachlässigbar beeinträchtigt. Das äußerst geringe Volumen an Sauerstoff und Stickstoff in der Kanüle wird zwar mitanalysiert, spielt jedoch, da es sich um Differenzmessungen handelt, keine Rolle, Deoxygeniert wird durch Eintauchen der Küvette in 70° C heißes Wasser. Die Sauerstoffmengen wurden durch Auswerten des Peaks nach der Formel Peakhöhe x Peakbreite in halber Peakhöhe bestimmt.

Ergebnis:
Es wurden mehrere Cyclen durchgeführt und ausgewertet. Dabei zeigte es sich, daß innerhalb der Meßgenauigkeit nach der Deoxygenierung der Sauerstoff im Probevolumen um einen kleinen, aber signifikanten Betrag höher war als vor dem Erhitzen. Dies läßt den Schluß zu, daß der Komplex Sauerstoff aufgenommen hatte, den er nach dem Erhitzen wieder abgegeben hatte. Ob dabei der Sauerstoff am Eisen des Hämins gebunden wird, oder ob es sich um Physisorption am Komplex handelt, kann nicht definitiv entschieden werden, da nicht bestimmt worden ist, wieviel Mol Sauerstoff por Mol Eisen gebunden worden ist. Nach (169) soll Physisorption jedoch nur bei hohen Sauerstoffpartialdrücken und bei tiefen Temperaturen (0° C) vorkommen, bei Bedingungen also, die im obigen Fall nicht zutreffen.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Der Einfluß der Proteinkomponente bei der Funktion der natürlichen Sauerstoffüberträger Hb und Mb sollte durch Modelle erforscht werden, bei denen der Proteinanteil durch synthetische Polymere ersetzt wird.
Hierzu wurden zwei imidazolhaltige Liganden, das API und ein Dipeptid der Sequenz H-His-Gly-OH synthetisiert und charakterisiert. Bei der Synthese letzteren traten anfängliche Schwierigkeiten auf, die aber durch ein verbessertes Peptidkupplungsverfahren überwunden werden konnten.
Beide Substanzen wurden an Hämin gekoppelt. Es wurden mehrere Verfahren ausprobiert, wobei sich verschiedene Chlorameisensäureester als am besten herausstellten. Sehr zeitraubend und verlustreich stellte sich die Aufarbeitung der Reaktionsansätze durch präparative Säulenchromatographie heraus. Dabei werden statt der erwarteten, für die weitere Synthese notwendigen Zwischenprodukte Hämin-(API)-OH und Hämin-(His-Gly-OMe)-OH nur die jeweiligen Methylester erhalten und zudem lassen ihre Ausbeuten zu wünschen übrig, da bei den Synthesen jeweils die unerwünschten Nebenprodukte Hämin-diAPI und Hämin-(diHis-Gly-OMe) in größeren Mengen entstehen.

Die Aufarbeitung eines Reaktionsansatzes mittels HPLC konnte nur im analytischen Maßstab erfolgreich durchgeführt werden.

Nach Herstellung von Hämin-(API)-His-Gly-OMe konnte dieses Produkt, allerdings nur mit geringer Beladung an ein POE hohen Molekulargewichts verknüpft werden.
Damit erweist sich bei Funktionalisierung von Polymeren, die als Modell von Hb und Mb dienen sollen, der klassische Syntheseweg als dann weniger geeignet, wenn bei dem Modell die prosthetische Gruppe (Eisenprophyrin und Ligand) jeweils kovalent in definierter Weise miteinander verknüpft werden sollen.

Besser ist es, so ein Modell vom jeweiligen Polymer aus aufzubauen, wenige Syntheseschritte klassisch vorzunehmen und dann die entstehenden Fragmente miteinander zu verbinden.

Wird das Modell vom Polymer aus nach der beschriebenen Vorschrift synthetisiert, so kann durch ^{1}H-NMR-Spektroskopie festgestellt werden, daß die Resonanzen der Dipeptidkomponente gut zu erkennen sind, während die Häminresonanzen ein schlechtes Signal/Rauschverhältnis zeigen.

Generell werden bei den NMR-Untersuchungen der Häminverbindungen große chemische Verschiebungen festgestellt. Je nach Lösungsmittel und Zahl der ungepaarten Elektronen werden charakteristische Resonanzmuster beobachtet, was besonders bei den Methylresonanzen des Hämins ausgeprägt ist. Es konnte gezeigt werden, daß je nach Zahl, Art der Liganden und Lösungsmittel das Fe(III) des Hämins in einer low-spin oder in einer high-spin Form vorliegt und beide Formen auch nebeneinander existieren können. Auf diese Weise konnten Rückschlüsse auf das Koordinationsverhalten der Liganden gezogen werden.

Das Oxygenierungsverhalten von POE-Gly-His-Hämin-API wurde im Festzustand untersucht. Dabei konnte durch GC nachgewiesen werden, daß der Komplex in der Lage war, Sauerstoff reversibel zu binden und ihn abzugeben, ohne nennenswert dabei oxidiert zu werden.

G. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Allgemeines

Ausbeuten (in %) beziehen sich auf die gereinigten Substanzen. Die Elementaranalysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium des Chemischen Zentralinstituts der Universität Tübingen durchgeführt.

1.1. Geräte und Instrumente

Geräte zur aneroben Säulenchromatographie:	siehe /52) S.
UV/VIS-Spektroskopie:	Beckman Acta M VII
IR-Spektroskopie:	Perkin-Elmer Spektralphotometer PE 210 und 221
pH-Meter und Dosimat:	Metrohm, Herisau
Fraktionssammler:	LKB Utrorac mit optischer Einheit, Uvicord I und Uvicord III, Fraktionssammler UA 5 ISCO
Aminosäureanalysator:	Beckman Unichrom und Multichrom
Schmelzpunktbestimmung:	Apparat n. Tottoli Typ SMP 20, Fa. Büchi
Massenspektren:	MS 9 der Fa. AEI (FD-Verfahren), Ionenquelle 82° C
AAS:	Beckman AAS m. Massman Küvette und Autolam Burnev II
Zentrifuge:	Sorval RD - 2B mit Rotoren SS 11 und 34
^{1}H-NMR-Spektren*:	Bruker WP 80, Meßtemperatur 27° C, Frequenz 80 MHz, Spektrenbreite 3.000 Hz;

* Ich danke Herrn Dr. K. Albert für die Aufnahme der Spektren.

Bruker WH 90, Frequenz 90 MHz, Meßtemperatur 27° C, Pulswinkel 4 µsec, Spektrenbreite bis 12.000 Hz; es wurden bis zu 60.000 FID'S akkumuliert.

^{1}H-NMR-Spektren bei den POE-Derivaten:
Diese erfolgten nach dem "homonuclear gated-decoupling"-Verfahren. Hierzu wurde mit Hilfe des Entkopplers des NMR-Gerätes die Frequenz des POE-Signals über eine gewisse Zeitdauer (3-5 sec) mit einer definierten Leistung (10^{-3} W) eingestrahlt. Dadurch wurde eine fast vollständige Signalabsättigung der POE-Protonen erreicht. Anschließend wurde das Spektrum mit abgeschaltetem Entkoppler aufgenommen. Der Vorgang Einstrahlen - Messen wiederholte sich nun so lange, bis nach Meinung des Operators ein zufriedenes Signal/Rauschverhältnis der Endgruppen erzielt wurde. Eine vollständige Signalunterdrückung wurde nicht angestrebt, um Einflüsse auf echte Substanzresonanzen zu minieren. Verfälschung im Verschiebungsbereich der eingestrahlten Resonanzen mußten in Kauf genommen werden.

^{13}C-NMR-Spektren: Bruker WP 80, Frequenz 20, 115 MHz, Spektrenbreite 4.800 Hz, Pulsinkel 3 µsec. Bruker WH 90, Meßtemperatur 27° C, Frequenz 22, 62 MHz, Pulswinkel 3 µsec. Es wurden bis zu 700.000 FID'S akkumuliert. Alle Spektren waren ^{1}H-breitbandentkoppelt.

HPLC-Versuche

Pumpe: Waters M 6.000 A

Einspritzsystem: U 6 K

Säulen:	V2A Stahlsäulen mit verschiedenen Adsorbenzien
Detektor:	Waters M 440 mit variabler Wellenlänge
Gradientelution:	Waters M 660 Solventprogrammer
Integrator und Schreiber:	HP 3380 A
Gesamtsystem:	Spektraphysics SP 8000

GC-Versuche

Gerät:	Perkin-Elmer Fraktometer 116
Säule:	Molekularsieb 5 Å
Schreiber:	Speedomax Typ 6
Detektor:	Hitzedraht (WLD)
Spezialküvette:	siehe Anhang
Gasdichte Spritze:	Hamilton

1.2. Chemikalien und Reagenzien

Reagenzien und Grundchemikalien:	Fa. Merck, Merck-Suchard, Fluka, Roth, Baker Die Lösungsmittel wurde nach (170) gereinigt und getrocknet und unter Molekularsieb aufbewahrt.
Polyäthylenglykole:	Fa. Hoechst, Roth Wurden vor Gebrauch in CH_2Cl_2 aufgelöst, 2 x mit Äther ausgefällt und getrocknet.
DC-Platten:	Fa. Merck, Fertigplatten 5 x 20 cm, Kieselgel 60 F_{254} HPTLC Platten, $RP_{8,\ 18}$

Aminosäuren:	Fa. Merck, Fluka
Sephadex LH 20:	Fa. Pharmacia
Laborgase:	Dreiring Stickstoff, Dreiring Wasserstoff (Messer Griesheim), Chlorgas, Chlorwasserstoffgas, Ammoniakgas (Gaslager, Universität Tübingen), 0,3 % Sauerstoff in Helium (Fa. Mast, Tübingen)
Aluminiumoxid:	Fa. Woelm
Kieselgele:	Fa. Machery-Nagel, Merck
Lösungsmittel für HPLC-Versuche:	Fa. Merck, Uvasol Qualität
1,2 n HCl in Eisessig:	In weniger als 1.000 ml Eisessig wurde 1,2 mol HCl-Gas (getrocknet) eingeleitet. Dann wird mit Eisessig auf 1 Liter aufgefüllt.
DCCI:	Im Hochvakuum destilliertes DCCI wurde als 2 m Lösung in CH_2Cl_2 eingesetzt.

2. Arbeitsverfahren (allgemein)

2.1. Dünnschichtchromatographie

Folgende Systeme wurden eingesetzt:

A_1	Butanol/Eisessig/Wasser	3 : 1 : 1
A_2	Butanol/Eisessig/Wasser	4 : 1 : 1
B	Benzol/Chloroform	1 : 4
C	Aceton/Chloroform	1 : 1
D_1	Chloroform/Methanol	2 : 1
D_2	Chloroform/Methanol	4 : 1
E_1	Benzol/Methanol	2 : 1
E_2	Benzol/Methanol	4 : 1
F	Methyläthylketon/Pyridin/ Wasser/Eisessig	70 : 15 : 15 : 2

Die Angaben sind Volumenverhältnisse.

2.2. Anfärbereagenzien und Methoden

Häminprodukte wurden durch Eigenfarbe sichtbar.

Ninhydrinfärbung: 300 mg Ninhydrin werden in 200 ml Butanol und 6 ml Eisessig gelöst. Mit diesem Reagenz wird das Chromatogramm besprüht, anschließend im Trockenschrank bei 110° C entwickelt (10 Min).
Freie Aminogruppen zeigen rötlich-violette Färbung (171).

Chlor-Tolidin-Test (172): 80 mg o-Tolidin, 15 ml Eisessig und 0,5 g KJ werden mit Wasser auf 250 ml aufgefüllt. Das mit Wasserdampf befeuchtete Chromatogramm wird 10 Min. in eine Chloratmosphäre gestellt. Nach dem Belüften wird die Platte mit dem Reagenz besprüht. Peptidbindungen zeigen gelb-blaue Flecken. Die beiden Tests können in der angegebenen Reihenfolge hintereinander gemacht werden.

2.3. Aminosäureanalysen

Ca. 2 µmol Peptid (POE-Peptid oder freies) werden in ein Hydrolyserohr eingewogen und mit ca. 3 ml 6 n HCl versetzt. Die Lösung wird in flüssigem N_2 eingefroren und das Rohr unter Vakuum zugeschmolzen. Die Hydrolyse erfolgt bei 110° C während 24 h. Nach Öffnen des Rohres wird die Lösung anschließend unter Vakuum eingedampft.
Der Rückstand wird nach Spackmann und Moore (173) analysiert.

3. Durchführung der Versuche

Z - Cl wurde nach (174) dargestellt.

Einsatz:	700 g Benzylalkohol
Ausbeute:	1.080 g Z - Cl
Boc-Azid:	Darstellung nach (175). Destillation des Reaktionsprodukts unter Vakuum bei 40°-50° C.
Einsatz:	200 g Boc-Hydrazid
Ausbeute:	170 g Boc-Azid (Lit: 180 g)

3.1. Histidinmethylesterdihydrochlorid (176), (H-His-OMe · 2 HCl)

100 g (0,52 Mol) Histidinhydrochlorid werden in 1000 ml abs. Methanol gelöst und mit 25 ml H_2SO_4 konz. 1 h unter Rückfluß gekocht. Anschließend wird 2 h unter Sieden ein trockener HCl-Gas-Strom eingeleitet. Danach wird unter fortgesetzter Gaseinleitung die Lösung auf -5° C abgekühlt (Eis-Kochsalz). Hierauf beginnt das Produkt auszufallen. Nachdem das Produkt vollständig ausgefallen ist, wird abgesaugt und mit Äther gewaschen. Dann löst man in abs. Methanol und fällt mit Äther um. Anschließend wird getrocknet.

Ausbeute: 95 g ≙ 75 % d.Th.
Fp: 198°-199° C Lit. (174) 200° C

Elementaranalyse:

ber.: C 34,72 % H 5.41 % N 17.35 %
gef.: C 34,60 % H 5,49 % N 17,48 %

3.2. Glycinmethylester . HCl (177), (H-Gly-OMe · HCl)

90 g (1,2 Mol) Glycin werden in 700 ml abs. Methanol suspendiert. Hierauf wird unter kräftigem Rühren und unter Sieden ein trockener HCl(g) Strom eingeleitet, bis das Glycin in Lösung gegangen ist. Anschließend wird wie oben unter HCl-Einleitung die Lösung auf -5° C abgekühlt, wobei das Produkt auszufallen beginnt. Man läßt ohne HCl-Gas eine weitere Stunde stehen, saugt ab, wäscht mit abs. Äther, trocknet im Exicator über Nacht, und fällt aus Methanol mit Äther um.

Ausbeute: 100 g ≙ 66 % d.Th.
Fp: 179° C Lit. 175° C

Elementaranalyse:

ber.: C 28,8 % H 6,4 % N 11,2 %
gef.: C 28,0 % H 6,1 % N 10.8 %

3.3. Boc-Glycin (178), (Boc-Gly)

37,5 g (0,5 Mol) Glycin werden in 150 ml einer Mischung von Dioxan/Wasser (1:1) gelöst. Am pH-Stat wird ein pH von 10 eingeregelt. Unter kräftigem Rühren werden 75 ml (0,55 Mol) Boc-Azid zugesetzt. Der pH-Wert wird durch schrittweise Zugabe von 4 n NaOH Lösung konstant gehalten. Nach Beendigung des Alkaliverbrauchs (8 h) wird die Lösung 2 x mit Äther ausgeschüttelt; der Ätherextrakt wird verworfen. Die wässrige Lösung wird mit etwa 200 ml Essigester überschichtet und unter Rühren und pH-Kontrolle mit verdünnter HCl auf pH 3 gebracht. Die angesäuerte Lösung wird 3 x mit Essigester ausgeschüttelt, die Extrakte vereinigt und 5 x mit 40 ml NaCl gesättigtem H_2O gewaschen (Ninhydrintest der Lösung muß negativ sein).

Anschließend wird mit Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt, worauf das Produkt unter Petrolätherzusatz kristallisiert. Es wird abgesaugt, und nochmals aus Essigäther/Petroläther umgefällt.

Ausbeute: 62 g ≙ 70 % d.Th. Lit. 88 %
Fp: 88° C Lit. ( ) 87° C - 89° C

Elementaranalyse:

ber.: C 48,0 % H 7,42 % N 8,0 %
gef.: C 48,3 % H 7,4 % N 7,9 %

3.4. N^{α}-N^{im}-Di-Boc-His-OH · DCA (179)

Vorbemerkung: Alle Reagenzien zur Aufarbeitung müssen bei 4° C vorgekühlt werden; bei der gleichen Temperatur muß aufgearbeitet werden (Kühlzelle).
13,2 g (0,08 Mol) freie Histidinbase "free-base" werden in etwa 500 ml DMSO (vorgetrocknet mit Molekularsieb) und 60 ml TEA suspendiert. Es werden 60 ml (0,44 Mol) Boc-Azid dazugegeben und die Lösung 48 h bei RT gerührt. Danach wird sie klar.
Aufarbeitung: Nach Zugabe von 1800 ml Wasser wird die Lösung 2 x mit je 400 ml Äther extrahiert. Die wässrige Phase wird auf 4° C gekühlt, mit 2,5 n HCl auf pH 2,5 gebracht und 2 x mit 400 ml Essigester extrahiert. Die beiden Essigesterauszüge werden 2 x mit 400 ml H_2O und 2 x mit 200 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über $MgSO_4$ bei RT getrocknet.
Nach Abzug des Essigesters erhält man 18 g eines zähen Öls. Die Hälfte des Produkts wird eine Nacht bei -21° C im Tiefkühlschrank aufbewahrt, und gleich danach umgesetzt.
Der andere Teil (9 g) wird in 50 ml Chloroform gelöst, auf 0° C gekühlt, mit 13 ml DCA versetzt und bei 0° C mit etwa 300 ml Petroläther verdünnt. Im Verlauf einer Woche kristallisiert das Produkt aus.

Ausbeute: 13,2 g Salz ≙ 60 % d.Th. Lit. (177) 67 %
bezogen auf die Hälfte des Einsatzes.
Fp: 162° C Lit. (177) 155° - 157° C

Elementaranalyse:

ber.:	C 62,68 %	H 8,95 %	N 10,44 %
gef.:	C 61,66 %	H 8,89 %	N 10,52 %

3.5. 3-(1-Imidazolyl)propylamin-dihydrochlorid (78)

1) 50 ml Acrylnitril (frisch destilliert) werden auf 75° C erhitzt. Dazu werden 27 g (0,4 Mol) Imidazol in kleinen Portionen zugefügt. Die Mischung wird langsam auf 90° C erhitzt und anschließend 2-3 h am Rückfluß gekocht (Kontaktthermometer). Nach Abkühlenlassen wird das Reaktionsgemisch im Vakuum zur Trockene eingedampft. Der gelbe, ölige Rückstand wird in 200 ml Methanol aufgenommen, von Unlöslichem abfiltriert und das Filtrat wiederum eingedampft.

2) Das erhaltene gelbliche Öl 2-(1-Imidazolyl)äthylcyanid wird in 300 ml abs. Methanol und 200 ml konz. wässriger Ammoniaklösung aufgenommen und im Autoklaven unter 30 atm. Wasserstoffdruck mit 8 g Raney-Nickel (Herstellung S. Organikum (168)) 3 h hydriert. Vom Katalysator wird abfiltriert und dieser mehrmals mit Methanol gewaschen.
Die vereinigten Filtrate (leicht grünlich) werden im Vakuum zur Trockene eingedampft. Der ölige Rückstand wird langsam (!) unter Kühlung in mit trockenem HCl gesättigtem Methanol aufgenommen. Nach Abzug des Methanols wird der weiße Rückstand in abs. Äthanol aufgelöst und in der Kälte kristallisieren gelassen. Man erhält weiße, hygroskopische Kristalle.

Ausbeute: 35 g ≙ 70 % Lit. (78) 87 %
Fp: 146° - 147° C Lit: (78) 141° - 145° C

Elementaranalyse:

ber.:	C 36,36 %	H 6,56 %	N 21,21 %	Cl 35,8 %
gef.:	C 35,9 %	H 6,61 %	N 20,44 %	Cl 34,0 %

3.6. Z-His-$NHNH_2$ (73)

45 g (0,18 Mol) H-His-OMe · 2 HCl werden in 380 ml Chloroform suspendiert, auf 0° C abgekühlt, mit 51,9 ml (0,37 Mol) frisch destilliertem TEA behandelt; anschließend werden 20,4 ml (0,093 Mol) Z-Cl dazugefügt. Nach 2 Min. Rühren werden wieder 26,1 ml (0,18 Mol) TEA dazugegeben. Nachdem alles wieder in Lösung ist, werden wieder 20,4 ml (0,093 Mol) Z-Cl dazugegeben.
Nach wenigen Min. wird das Eisbad entfernt und die Lösung 30 Min. bei RT stehen gelassen. Die Chloroformlösung wird 3 x mit 150 ml H_2O gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Zum Entfernen überschüssigen Z-Cl wird 3 x etwa 20 ml Äthanol abs. dazugegeben und die Lösung jeweils abgezogen. Dann wird das verbleibende Öl (Z-His-OMe) in 90 abs. Äthanol gelöst, 16,6 ml 100 % Hydrazinhydrat zugefügt und die Lösung bei RT stehen gelassen. Nach 24 h wird die Lösung gekühlt, das Produkt abgesaugt, mit Äther gewaschen und getrocknet.
Umkristallisieren aus heißem Wasser.

Ausbeute: 21 g ≙ 37 % d.Th. Lit. (73) 42 %
bezogen auf H-His-OMe · 2 HCl
Fp: 169° C Lit. (73) 171° - 173° C

Elementaranalyse:

ber.:	C 55,43 %	H 5,64 %	N 23,08 %
gef.:	C 55,14 %	H 5,71 %	N 22,94 %

DC: einheitlich (Laufmittel A_1, B)

3.7. Z-His-Gly-OMe (180)

21 g (0,07 Mol) Z-His-$NHNH_2$ werden in 180 ml DMF suspendiert, auf -10° C abgekühlt (Eis/Kochsalz), mit 101,25 ml einer 3 N HCl/Dioxan-Lösung langsam (!) versetzt. (3 N HCl/Dioxan wird durch Einleiten entsprechender Menge HCl Gas in Dioxan abs. erhalten; muß zur Synthese auf 0° C abgekühlt werden). Hierauf werden 10,35 ml (0,09 Mol) t-Butylnitrit in 31,5 ml DMF zugetropft, wobei die Temperatur unter -10° C bleiben sollte, und 10 Min. gerührt. Dann werden 31,05 ml (0,225 Mol) TEA in 75 ml DMF (alles vorgekühlt) zugetropft.
Vor der ganzen Prozedur werden 9 g (0,072 Mol) H-Gly-OMe · HCl in 250 ml DMF gelöst und auf-10° C abgekühlt.
Dann wird die Glycinesterlösung in DMF zur obigen Lösung des Azids gegeben und bei -12° C innerhalb 15 Min. 9,3 ml (0,07 Mol) TEA zugetropft, 1 h bei -10°, 12 h bei 0° C und 5 h bei RT gerührt. Das DMF wird i.V. abgezogen (40° C). Man nimmt den Rückstand in 600 ml gesättigter $NaHCO_3$-Lösung auf, extrahiert mit 750 ml CH_2Cl_2 und trocknet (Na_2SO_4). Nach dem Filtrieren wird eingeengt, Essigester dazugegeben und das Produkt auskristallisieren lassen. Umkristallisieren aus Chloroform/Essigester.

Ausbeute: 14 g ≙ 55 % d.Th.
Pf: 120° C
DC: Rf in Laufmittel A_1 0,43 , einheitlich

Elementaranalyse:

ber.:	C 56,6 %	H 5,55 %	N 15,55 %
gef.:	C 56,74 %	H 5,5 %	N 15,34 %

3.8. Synthese der Häminderivate

3.8.1. Hämin-(API)-OMe

3.8.1.1. Ansatz I

1,3 g (2 mMol) Hämin ≙ 4 mMol COOH-Gruppen werden in 30 ml DMF gelöst, auf -10° C abgekühlt und 1 ml einer 2n DCCI-Lösung in CH_2Cl_2 dazugegeben (≙ 2 mMol DCCI). Es wird 10 Min. bei -10° C und weitere 30 Min. bei RT gerührt. Hierauf gibt man 390 mg (2 mMol) API in 10 ml DMF und 0,404 g (4 mMol) TEA dazu. Die Lösung wird noch 2 h bei 0° C, weitere 4 h bei RT gerührt. Dann wird vom ausgefallenen DC-Harnstoff und TEA · HCl filtriert, die Lösung eingedampft und in wenig Volumen einer Benzol/Methanol-Lösung (100:2) aufgenommen.
Aufarbeitung nach (95).
Mit 150 g Al_2O_3 (Aktivität I) wird in Benzol/Methanol (100:2) eine Chromatographiesäule (45 cm x 2,5 cm) gepackt. Darauf wird das Rohprodukt aufgetragen und mit folgenden Gradienten aus Benzol/Methanol eluiert (in Klammern die Volumina):
100 : 2 (3 l); 100 : 5 (2,5 l); 100 : 10 (4 l); 100 : 15 (2 l); 100 : 30 (4 l). Die Fraktionen werden gesammelt und mittels DC auf Einheitlichkeit untersucht.
Das Hauptprodukt bei 100 : 30 wird gesammelt, vom Lösungsmittel befreit und getrocknet.

Ausbeute: 500 mg Hämin-diAPI

Wiederholung des Verfahrens mit Kieselgel als Trennungsmittel ergibt keine besseren Ergebnisse.

3.8.1.2. Ansatz II

5,2 g (8 mMol) Hämin ≙ 16 mMol COOH-Gruppen werden in 60 ml DMF gelöst und auf -10° C abgekühlt. Man gibt 1,2 ml (8 mMol) TEA dazu. Anschließend werden 0,764 ml (8 mMol) Chlorameisensäureäthylester dazugefügt. Die Mischung wird 20 Min. bei -5° C bis -10° C gerührt, dann wird eine Mischung aus 1,5 g (8 mMol) API und 2,4 ml (16 mMol) TEA in 10 ml DMF dazugesetzt.

Man rührt 10 Min. bei -5° C und läßt die Mischung langsam auf RT kommen. Die Lösung wird filtriert, eingedampft und der Rückstand in wenig Chloroform/Methanol (100:2) aufgenommen. Eine Säule (90 cm x 5 cm) wird mit Kieselgel in Chloroform gepackt, das Rohprodukt aufgetragen und mit Chloroform und folgenden Chloroform/Methanolgradienten eluiert:
100 : 2; 100 : 5; 100 : 6; 100 : 10; 100 : 20.
Es wird immer solange mit einem Gradienten eluiert, bis die jeweiligen bei diesen Gradienten heruntergekommenen Produkte die Säule verlassen haben.
Die einzelnen Fraktionen werden auf Einheitlichkeit im DC überprüft, einheitliche Fraktionen gesammelt und das Lösungsmittel abgezogen (Laufmittel A_2, D_1, F).
Die 3 Hauptfraktionen sind (in der Reihenfolge, in der sie von der Säule kommen):

Fraktion I Hämindimethylester: 30 mg
Fraktion II Hämin-(API)-OMe: 170 mg, Rf: 0,64 (Laufmittel F)
Fraktion III Hämin-diAPI: 1,54 g, Rf: 0,23 (Laufmittel D_1)
Nähere Charakterisierung im allgemeinen Teil.

Elementaranalyse:

Hämin-(API)-OMe
ber.: C 63,64 % H 5,56 % N 12,67 % Cl 4,65 %
gef.: C 58,7 % H 6,24 % N 9,57 % Cl 5,59 %

Hämin-diAPI
ber.: C 63,74 % H 5,77 % N 16,16 % Cl 4,15 %
gef.: C 58,4 % H 6,77 % N 13,88 % Cl 7,36 %

3.8.1.3. Ansatz III

Die Kupplung von API an Hämin verläuft wie bei Ansatz II, jedoch wird nur die Hälfte an API, Chlorameisensäureester und TEA zugegeben.
Aufarbeitung (91)
Nach Filtration der Lösung wird diese in 400 ml H_2O gegeben, der pH Wert auf 7 gebracht, der Niederschlag abzentrifugiert, mit H_2O gewaschen und gut getrocknet. Die Hälfte des Rohprodukts (die andere wurde für die HPLC-Trennungen verwendet) wird in wenig Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) gelöst und auf eine Kieselgelsäule (40 cm x 2,5 cm) aufgetragen, die mit demselben Gemisch eluiert wird. Die herunterkommenden Fraktionen werden mit DC untersucht (Laufmittel A_2, D_1).
Es kann nur eine teilweise Abtrennung des Hämins von den anderen Reaktionsprodukten erreicht werden. Diese werden gesammelt, vom Lösungsmittel befreit, in wenig Chloroform gelöst und erneut auf eine Kieselgelsäule (40 cm x 2,5 cm), die mit dem gleichen Laufmittel äquilibriert ist, aufgetragen.
Es wird mit denselben Gradienten von Ansatz II eluiert.
Man erhält folgendes Ergebnis:

I	Hämindimethylester:	7 mg
II	Hämin-(API)-OMe:	20 mg
III	Hämin-diAPI:	400 mg

3.8.2. Hämin-(API)-ONP

1,6 g (1,6 mMol) Hämin-diONP werden in 25 ml DMF gelöst. Dazu gibt man 0,179 g (0,19 mMol) API und 0,25 ml (1,8 mMol) TEA in 5 ml DMF. Es wird 6 h bei RT gerührt. Nach der Filtration wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rest in wenig Chloroform/Benzol (1:1) aufgenommen und auf eine Aluminiumoxidsäule (Akt.V) aufgetragen, die mit demselben Gemisch hergestellt wird. Eluiert wird mit folgenden Gradienten:

Chloroform/Benzol/Methanol 50 : 50 : 0
Chloroform/Benzol/Methanol 50 : 50 : 2
Chloroform/Benzol/Methanol 50 : 50 : 5
Chloroform/Benzol/Methanol 50 : 50 : 10

Nach üblicher Aufarbeitung werden 3 Fraktionen erhalten

I Ausgangsprodukt 30 mg
II Hämin-(API)-ONP 25 mg, RF (Laufmittel D_1) = 0,7
III Hämin-diAPI 200 mg

Von II wurde ein IR-Spektrum aufgenommen und gleich mit H-His-Gly-OMe umgesetzt (siehe allgemeiner Teil).

3.8.3. Hämin-(His-Gly-OMe)-OMe

3.8.3.1. Abspaltung der Z-Schutzgruppe von Z-His-Gly-OMe

1,44 g (4 mMol) Z-His-Gly-OMe werden in 10 ml Methanol und 15 ml 1 n HCl-Lösung gelöst. Es werden 200 mg Pd/C Katalysator dazugegeben und Wasserstoff durch die Lösung geleitet. Nach einer Weite tritt der Geruch von Toluol auf. Es wird so lange Wasserstoff eingeleitet, bis das DC kein geschütztes Dipeptid anzeigt. Dann wird vom Katalysator abfiltriert, der Katalysator mit wenig Methanol gewaschen und das Filtrat zur Trockene eingedampft. Es wird ohne weitere Reinigung für den folgenden Schritt umgesetzt.

3.8.3.2. Kupplung von H-His-Gly-OMe . 2 HCl an Hämin

Zu einer Lösung von 2,6 g (4 mMol) Hämin ≙ 8 mMol COOH-Gruppen in 25 ml DMF werden bei -10° C 0,553 ml (4 mMol) TEA gegeben. Hierzu werden 0,382 ml (4 mMol) Chlorameisensäureisobutylester gegeben. Die Mischung wird 20 Min. bei -5° C bis -10° C gerührt. Anschließend gibt man eine auf 0° C gekühlte Lösung von 4 mMol H-His-Gly-OMe und 1,14 ml (8 mMol) TEA in 10 ml DMF dazu. Man rührt noch 15 Min. bei -5° C und läßt langsam auf RT kommen. Die Lösung wird filtriert, eingedampft

und in wenig Benzol/Methanol (100:2) aufgenommen und auf eine Aluminiumoxidsäule (Akt. I) aufgetragen, die mit demselben Laufmittel gepackt wird. Es wird mit folgenden Gradienten eluiert:

Benzol/Methanol 100 : 2
Benzol/Methanol 100 : 4
Benzol/Methanol 100 : 8
Benzol/Methanol 100 : 15

Nach dem üblichen Aufarbeiten erhält man wieder drei Hauptprodukte:

I Hämindimethylester 15 mg
II Hämin-(His-Gly-OMe)-OMe 150 mg, Rf (Laufmittel D_2) = 0,55
III Hämin-diHis-Gly-OMe 800 mg

Elementaranalyse: Hämin-(His-Gly-OMe)-OMe

ber.:	C 60,34 %	H 5,37 %	N 12,8 %	Cl 4,11 %
gef.:	C 58,3 %	H 7,00 %	N 12,01 %	Cl 3,86 %

Hämin-diHis-Gly-OMe

ber.:	C 58,42 %	H 5,24 %	N 15,73 %	Cl 3,37 %
gef.:	C 56,7 %	H 6,77 %	N 13,9 %	Cl 5,2 %

3.8.4. Hämin-diONP

Das Produkt wird nach (84) hergestellt. Es wird auf einer Aluminiumoxidsäule (Akt. V) mit dem Laufmittel Äther/Chloroform (1:1) gereinigt.

Einsatz: 3,9 g Hämin

Ausbeute: 1,3 g Rf (Laufmittel B) = 0,6

Auf eine Elementaranalyse wurde verzichtet.

3.8.5. Hämin-(API)-His-Gly-OMe

3.8.5.1. Verseifung von Hämin-(API)-OMe

130 mg (170 mMol) Hämin-(API)-OMe werden in 5 ml einer Mischung aus DMF, Wasser und Methanol gelöst. Man gibt 3 ml 0,1 n NaOH dazu und rührt 2 h bei RT. Dann wird der pH mit 0,1 n HCl auf 6 gebracht und die Lösung eingedampft. Der Rückstand wird in 5 ml DMF aufgenommen und in 40 ml H_2O gegeben. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, gut gewaschen und über P_4O_{10} im Vakuum getrocknet.

3.8.5.2. Kupplung von H-His-Gly-OMe an Hämin-(API)-OH

72 mg (200 mMol) Z-His-Gly-OMe werden wie 3.8.3. beschrieben entacyliert.
Das oben beschriebene verseifte Produkt wird in 7 ml DMF gelöst. Bei -5° C gibt man 17,5 ml (170 mMol) NMM und 15 ml (170 mMol) Chlorameisensäureäthylester in 5 ml Äther (Zugabe durch Spritzen!) dazu und rührt 20 Min. bei -5° C. Hierauf wird eine auf 0° C abgekühlte Lösung von H-His-Gly-OMe . 2 HCl und 35 ml (340 mMol) NMM in 4 ml DMF dazugegeben. Es wird 20 Min. bei -5° C, 30 Min. bei 0° C gerührt. Anschließend läßt man auf RT kommen und dampft ein. Man löst in wenig Chloroform, trägt auf eine kleine Kieselgelsäule (20 x 1 cm) und eluiert mit Chloroform. Das Hauptprodukt wird aufgefangen. DC-Analyse zeigt, daß kein Ausgangsprodukt vorhanden ist.

Ausbeute: 25 mg

Elementaranalyse:

ber.:	C 60,68 %	H 5,67 %	N 15,8 %	Cl 3,71 %
gef.:	C 58,9 %	H 6,4 %	N 14,0 %	Cl 4,3 %

3.8.6. Hämin-(API)-His-Gly-OMe

Die Verseifung wird analog 3.8.5.1. durchgeführt.

3.8.7. POE_{20}-Gly-His-Hämin-API

200 mg (10 Mol) POE_{20} werden in 5 ml Methylenchlorid gelöst. Dazu gibt man 18 mg (18,5 Mol) Hämin-(API)-His-Gly-OH in 3 ml DMF, 20 Mol DCCI in 100 µl CH_2Cl_2 und 10 µl Pyridin (alles in Spritzen). Die Mischung wird auf 40° C erwärmt und unter Stickstoff 2 Tage gerührt. Nach dem Abkühlen wird vom ausgefallenen DC-Harnstoff (sehr wenig) abfiltriert. Die Lösung wird eingedampft (im Vakuum). Der Rückstand wird in einer Mischung aus Methylenchlorid/Äthanol (1:1) aufgenommen und das Polymer mit Äther gefällt.
Das ausgefallene Polymer wird erneut in der gleichen Mischung gelöst, und wieder mit Äther ausgefällt. Dann wird noch zwei Mal mit Äther aus Methyläthylketon/Methanol 1:1 ausgefällt. Dann ist kein überschüssiges Häminprodukt mehr im DC zu sehen.

Ausbeute: 150 mg

Eine Beladungsbestimmung mittels ASA ergab eine Beladung von nur 20 %.

3.9. Synthese des Hämopolymers POE-Gly-His-Hämin-API nach der LPM

Vorbemerkung: Laufmittel A_1 diente bei allen Kupplungen zum Nachweis der Abwesenheit von überschüssigen niedermolekularen Produkten. Die Aminosäuren werden als Boc-geschützte symmetrische Anhydride gekuppelt, die nach (181) hergestellt werden.

3.9.1. POE_3-Gly-Boc

12 g POE_{3000} (8 mMol OH-Gruppen) werden in 80 ml CH_2Cl_2 gelöst. Dazu wird eine Lösung von 32 mMol $(Boc\text{-}Gly)_2O$ in CH_2Cl_2 filtriert, die man vorher separat hergestellt hat. Man gibt 5 ml Pyridin dazu und rührt einen Tag bei RT. Nach einer Zwischenfällung (Ätherzugabe, Einrotieren, Wiederauflösen in CH_2Cl_2) wird noch 1 h weitergerührt. Nach Einengen der Lösung wird mit Äther ausgefällt. Das abfiltrierte Produkt wird noch 2 x aus CH_2Cl_2 mit Äther ausgefällt. Überschüsse sind dann keine nachweisbar. Es wird über P_4O_{10} getrocknet.

Ausbeute: 11,5 g Beladung mit Glycin 90 % (ASA)

3.9.2. POE_3-Gly-$NH_3^+AcO^-$

10 g POE_3-Gly-Boc werden in 1,2 n HCl/AcOH 30 Min. gerührt. Dann wird am Rotationsverdampfer weitgehend abgezogen. Der verbleibende ölige Rückstand wird in CH_2Cl_2 aufgenommen und mit Äther gefällt (unter Eiskühlung). Anschließend wird noch 2 x mit Äther aus CH_2Cl_2 gefällt und getrocknet.

Ausbeute: 9,5 g

3.9.3. POE_3-Gly-His(N^{im}Boc)N^{α}-Boc

6 g POE_3-Gly-$NH_3^+AcO^-$ (4 mMol funktionelle Gruppen) werden in 60 ml CH_2Cl_2 gelöst, mit NMM auf pH 7 gebracht und auf 0° C gekühlt. Dazu wird eine Lösung von 20 mMol $(N^{\alpha}\text{-Boc}(N^{im}\text{Boc})\text{His})_2O$ in 20 ml CH_2Cl_2 (vorher separat hergestellt) zufiltriert. Man rührt 1 h bei 0° C und läßt langsam auf RT kommen.
Nach 2 h wird die Lösung etwas eingeengt und in der Kälte das Polymerprodukt mit Äther gefällt. Wegen des geringen Molekulargewichts des Polymers fällt dieses etwas schwieriger. Es wird noch einmal aus CH_2Cl_2 mit Äther und einmal aus Äthanol mit Äther gefällt. Dann sind keine Überschüsse mehr nachweisbar.

Es wird im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 5 g

ASA: Gly: His: 1 : 0,9 (theoretisch 1 : 1)

3.9.4. POE_3-Gly-His-$NH_3^+ \cdot AcO^-$

Die Abspaltung der Boc-Gruppen erfolgte analog 3.9.2.. Es wurde ein Mal aus CH_2Cl_2 und ein Mal aus Äthanol mit Äther gefällt.

Ausbeute: 4,5 g

3.9.5. POE_3-Gly-His-Hämin (55)

5,86 g (9 mMol) Hämin werden in 100 ml einer Mischung aus DMF/CH_2Cl_2 1:1 gelöst und auf 0° C abgekühlt. 9 mMol DCCI in 170 ml CH_2Cl_2 werden innerhalb 15 Min. zugetropft. Nach 2 h wird vom ausgefallenen DC-Harnstoff abfiltriert. Das Filtrat wird direkt in einen Kolben gesaugt, wo sich eine mit NMM auf pH 6 gebrachte Lösung von 4 g POE_3-Gly-His-NH_2 in 50 ml CH_2Cl_2 befindet. Man engt die Lösung auf 100 ml ein und rührt 3 Tage bei RT. Dann wird das Polymer mit Äther in der Kälte gefällt. Es wird noch 2 x aus CH_2Cl_2/DMF (1:1) und 2 x aus Äthanol gefällt. Dann sind keine Hämin-überschüsse nachzuweisen.

Ausbeute: 3,5 g Beladung: 90 % (AS) UV: 50 %

3.9.6. POE_3-Gly-His-Hämin-API

1,5 g POE_3-Gly-His-Hämin ($\sim$ 0,76 mMol funktionelle Gruppen) werden in 40 ml CH_2Cl_2/DMF (1:1) gelöst und auf 0° C abgekühlt. Hierzu gibt man 103 mg HOBT in 10 ml THF und 0,76 mMol DCCI in 15 ml CH_2Cl_2 dazu. Nach 20 Min. Rühren wird vom ausgefallenen DC-Harnstoff abfiltriert. Zum Filtrat gibt man eine Lösung von 985 mg (5 mMol) API und 10 mMol NMM in 10 ml DMF. Man engt die Lösung auf 15 ml ein und rührt einen Tag. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wird der

Rückstand in soviel warmem Äthanol aufgenommen, daß eine 5-10 %-ige Lösung entsteht. In der Kälte kristallisiert das Produkt aus. Es wird abzentrifugiert (25 Min. bei 10.000 U/Min.) und abdekantiert. Anschließend wird der Niederschlag mit Äther gewaschen. Dann wird noch 2 x aus Äthanol mit Äther gefällt. Überschüsse sind dann nicht mehr nachweisbar.

Ausbeute: 1,3 g Beladung: 70 % (ASA) bezogen auf Gly = 1

3.10. Versuch zum qualitativen Nachweis des gebundenen Sauerstoffs bei der reversiblen Oxygenierung von POE_{12}-Gly-His-Hämin-API im Festzustand

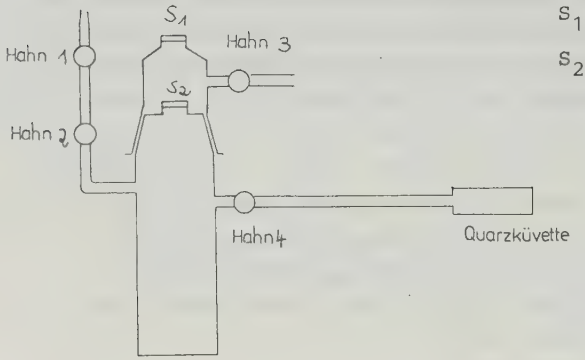
Das reduzierte Polymer wurde nach (52) hergestellt.

In einem kleinen 3-Halskolben mit 2 Hähnen und einer Schraubkappe mit durchstechbarem, diffusionsdichtem Gummiseptum werden 3 g Polymer ($\sim$ 0,5 mMol Eisenzentren) in bidestilliertem Wasser mit 1,6 g $Na_2S_2O_4$ (10 mMol) unter Stickstoff reduziert. Mit einer Spritze, die durch das Gummiseptum gestochen wird, wird ein Teil der Reaktionslösung entnommen und die in (52) beschriebene anaerobe Säulenchromatographie mit Sephadex G25 durchgeführt, um das überschüssige $Na_2S_2O_4$ zu entfernen. Die Lösung wird in das im Anhang skizzierte Spezialgefäß aufgefangen. Nach Aufnahme des UV-Spektrums mittels der angesetzten Quarzküvette wird die Lösung vorsichtig in flüssigem N_2 eingefroren und über Nacht im Hochvakuum gefriergetrocknet. Das entstehende lockere Pulver wird unter Vakuum aufbewahrt.

Durchführung der Oxygenierung:
Das Trägergas des Gaschromatographen wird eingeschaltet und der Apparat betriebsfertig gemacht.
Bei geschlossenem Hahn 2 und offenem Hahn 1 (Skizze S. 84) wird der Raum zwischen Dreiweghahn und dem 2. Hahn mehrfach sekuriert, d.h. abwechselnd evakuiert und mit dem Prüfgas (0,3 % O_2 in Helium) gefüllt.

Dasselbe wird mit dem Raum zwischen Dreiwegehahn und der ersten Gummikappe (bei offenem Hahn 3) gemacht. Nun wird Hahn 3 geschlossen, Hahn 1 und Hahn 2 geöffnet und der Komplex 1 Min. mit dem Gasgemisch äquilibriert. Hahn 1 und 2 werden geschlossen. Mit der gasdichten Spritze (bei geschlossenem Spritzenhahn) wird zunächst Septum 1 durchstoßen und bei offenem Hahn 3 der Gasraum der Spritzenkanüle sekuriert. Die Spritze muß dabei senkrecht gehalten werden und darf sich nicht beugen. Hahn 3 wird geschlossen, Septum 2 durchstochen, der Spritzenhahn geöffnet und langsam 5 ml Gas eingesogen. Der Gasspritzenhahn wird geschlossen, die Spritze herausgezogen, 10 sec. gewartet und das Gasgemisch schnell in den GC gespritzt. Anschließend werden Hahn 1 und 2 geöffnet, um den Verlust an analysiertem Gas in der Küvette zu ersetzen.
Dann wird die Küvette in ein 70° C heißes Wasserbad (Thermostat) getaucht (zum Deoxygenieren) und nach 7 Min., während die Küvette im Wasserbad ist, wie vorhin beschrieben, 5 ml Gas eingesogen und im GC analyisert. Nach der Analyse wird die Küvette wieder auf RT gebracht und der Verlust an analysiertem Gas durch Öffnen von Hahn 1 und Hahn 2 ersetzt. Es kann ein neuer Cyclus gestartet werden. Da es sich um Differenzmessungen handelt, muß bei beiden Messungen auf gleiche Bedingungen geachtet werden.

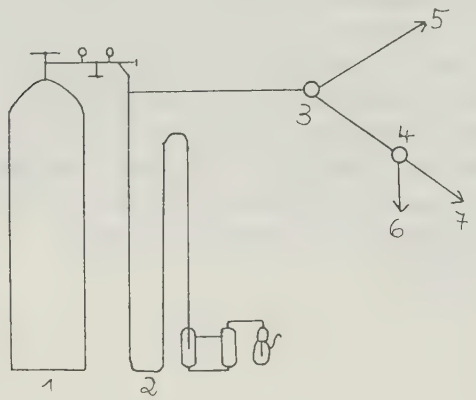
1) Skizze der Oxygenierungsapparatur



S_1 = Septum 1

S_2 = Septum 2

2) Schaltskizze der Oxygenierungsapparatur



1 = Gasflasche (0,3 % O_2 in Helium)

2 = Manometer mit Überdruckventil

3 = Dreiwegehahn

4 = Zweiwegehahn

5 = Vakuumseite

6 = zu Hahn 1 und 2

7 = zu Hahn 3

H. LITERATURVERZEICHNIS

1) A.L. Lehninger, Biochemie, 2. Auflage, Kap. 18, 19
2) E. Bayer, P. Schretzmann, Structure and Bonding 8, 123 (1969)
3) M.F. Perutz, Anv.Rev.Biochem. 48, 327 (1979)
4) A.H. Corwin, Z. Reyes, J.Am.Chem.Soc. 78, 2437 (1956)
5) R. Hill, Biochem.J. 19, 341 (1925)
6) A.H. Corwin, J.G. Erdman, J.Am.Chem.Soc. 68, 2473 (1946)
7) I.A. Cohen, J.Am.Chem.Soc. 91, 1980 (1969)
8) E.B. Fleischer, T.S. Srivastata, J.Am.Chem.Soc. 91, 2403 (1969)
9) N. Sadasivan, H.I. Eberspaecher, W.H. Fuchsman, W.S. Caughey, Biochemistry 8, 534 (1969)
10) J.G. Alben, W.H. Fuchsman, C.A. Beaudreau, W.S. Cuaghey, Biochemistry 7, 623 (1968)
11) I.A. Cohen, W.S. Caugheiy in: "Hemes and Hemoproteins", B. Chance et all, Ac.Press New York, 1966, S. 577
12) I.A. Cohen, W.S. Caughey, Biochemistry 7, 636 (1968)
13) C.K. Chang, T. Powell, T.G. Traylor, Croat. Chem.Acta 49, 295 (1977)
14) H. Dickmann, C.K. Chang, T.G. Traylor, J.Am.Chem.Soc. 93, 4068 (1971)
15) J.Almong, J.E. Baldwin, R.L. Dyer, M. Peters, J.Am.Chem.Soc. 97, 226 (1975)
16) J. Alming, J.E. Baldwin, J. Huff, J.Am.Chem.Soc. 97, 228 (1975)
17) J.E. Baldwin, J. Huff, J.Am.Chem.Soc. 95, 5757 (1973)
18) J.R. Budge, P.E. Ellis, R.D. Jones, J.E. Linard, T. Szymanski, F. Basolo, J.E. Baldwin, R.L. Dyer, J.Am.Chem.Soc. 101, 4762 (1979)
19) P.E. Ellis, J.E. Linard, T. Szymanski, R.D. Jones, J.R. Budge, F. Basolo, J.Am.Chem.Soc. 102, 1889 (1980)
20) J.E. Linhard, P.E. Ellis, J.R. Budge, R.D. Jones, F. Basolo, J.Am.Chem.Soc. 102, 1896 (1980)

21) A.R. Battersby, A.D. Hamilton, J.Chem.Soc.Chem.Commun. 117 (1980)
22) N. E. Kagan, D. Manzerall, R.B.M. Merrifield, J.Am.Chem.Soc. 99, 5484 (1977)
23) A.R. Battersby, G.D. Buckley, S.G. Hartley, M.D. Turnbull, J.Chem.Soc.Chem.Commun. 879 (1976)
24) J.E. Baldwin, T. Klose, M. Peters, J.Chem.Soc.Chem. Commun. 881 (1976)
25) C.K. Chang, J.Am.Chem.Soc. 99, 2819 (1977)
26) J.P. Collman, R.R. Gagne, T. Halbert, J.C. Marchon, C.A. Reed, J.Am.Chem.Soc. 95, 7868 (1973)
27) H. Ogoski, H. Sugimoto, Z. Yoshida, Tetrahedron Lett. 169, 1515 (1977)
28) M. Momenteau, B. Loock, J.Mol.Catal. 7, 315 (1980)
29) C.K. Chang, T.G. Traylor, Proc.Natl.Acad.Sci., USA 70, 2647 (1973)
30) C.K. Chang, T.G. Traylor, J.Am.Chem.Soc. 95, 5810 (1973)
31) G.L.Wagner, R.J. Kassner, J.Am.Chem.Soc. 96, 5593 (1974)
32) W.S. Brinigar, C.K. Chang. J.Am.Chem.Soc. 96, 5595 (1974)
33) W.S. Brinigar, C.K. Chang, J. Geibel, T.G. Traylor, J.Am.Chem.Soc. 96, 5597 (1974)
34) D.L. Anderson, C.J. Weschler, F. Basolo, J.Am.Chem.Soc. 96, 5599 (1974)
35) J. Almong, J.E. Baldwin, R.L. Dyer, J. Huff, C.J. Wilkerson, J.Am.Chem.Soc. 96, 5600 (1974)
36) H.J. Wang, J.Am.Chem.Soc. 80, 3168 (1958)
37) O. Leal, D.L. Anderson, R.G. Bowman, F. Basolo, R.L. Burwell jr., J.Am.Chem.Soc. 97, 5125 (1975)
38) M. Hatano, Kagakuto Kogyo (Tokio) 18, 926 (1965)
39) J.H. Fuhrhop, S. Beserke, W. Vogt, J. Ernst, J. Subramanian, Makromol.Chem. 178, 2621 (1977)
40) I.A. Vasilenko, I.P. Radkhyn, Dokl.Akad.Nauk. SSR, 241, 963 (1978)
41) E. Tsuchida, K. Honda, H. Sata, Biopolymers 13, 2147 (1974)

42) E. Tsuchida, K. Honda, Polymer J. 7, 4898 (1975)
43) E. Tsuchida, K. Honda, E. Hasegawa, Bioch.Biophys.Acta 393, 483 (1975)
44) E. Tsuchida, E. Hasegawa, K. Honda, Biochem.Biophys. Res.Comm. 67, 864 (1975)
45) E. Tsuchida, K. Honda, H. Sata, Inorg.Chem. 15, 352 (1976)
46) E. Tsuchida, K. Honda, Chem.Lett. 119 (1975)
47) K. Honda, E. Tsuchida, H. Sata, Bull.Chem.Soc.Jap. 49, 868 (1976)
48) E. Tsuchida, H. Nishide, Adv.Polymer Sci. 24, 1 (1977)
49) E. Hasegawa, Thesis 1978, Waseda University Tokyo
50) H.R. Allcock, P.P. Greiger, J.E. Gardner, J.L. Schmutz, J.Am.Chem.Soc. 101, 606 (1979)
51) E. Bayer, G. Holzbach, Angew.Chem.Int.Ed.Engl. 16, 117 (1977)
52) G. Holzbach, Dissertation, Universität Tübingen 1977
53) C. Hohmann, Diplomarbeit, Universität Tübingen 1976
54) C. Hohmann, Dissertation, Universität Tübingen 1979
55) M. Schleinzer, Diplomarbeit, Universität Tübingen 1978
56) E. Antonini, M. Brunori in: "Hemoglobin and Myoglobin and Their reactions with Ligands", Am.Elsevier, New York 1971, S. 221
57) J.H. Wang, A. Nakahara, E.B. Fleischer, J.Am.Chem. Soc. 80, 1109 (1958)
58) J.H. Wang, Accounts Chem.Res. 3, 90 (1970)
59) S.G. Seligar, J.D. Lipscomb, P.G. Debrunner, I.C. Gunsalus, Biochem.Biophys.Res.Comm. 61, 299 (1974)
60) M. Brunor, G. Falcioni, E. Fioretti, B. Giordina, E. Rotilio, Eur.J.Biochem. 53, 99 (1975)
61) G.N. Schranzer, L.P. Lee, J.Am.Chem.Soc. 92, 1551 (1970)
62) J.J. Weiss, Nature (London) 84 (1964)
63) C.H. Barlow, J.C. Maxwell, W.J. Wallace, W.S. Caughey, Bioch.Biophys.Res.Comm. 55, 91 (1973)

64) J.C. Maxwell, J.A. Volpe, C.H. Barlow, W.S. Chaughey, Biophys.Biochem.Res.Comm. 58, 166 (1974)
65) J.P. Collman, J.I. Braunman, T.R. Halbert, K.S. Suslick, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 73, 3333 (1976)
66) R.G. Little, J.A. Ibers, J.Am.Chem.Soc. 96, 4452 (1974)
67) C.K. Chang, T.G. Traylor, Proc.Natl.Acad.Sci., USA 72, 1166 (1975)
68) E. Bayer, M. Mutter in J. Meierhofer, E. Gross, The Peptides, Analysis, Synthesis, Biologie, Vol. 3, Acad.Press, New York 1979
69) siehe 54) S. 56
70) B. Kolb, CZ-Chemie Technik 1 87 (1972)
71) R.F. Labbe, G. Nishida, Biochem.Biophys.Acta 26, 437 (1957)
72) Houben/Weyl: Synthese von Peptiden, Band I, S. 541-557
73) R.W. Holley, E. Sondheimer, J.Am.Chem.Soc. 76, 1362 (1954)
74) H. Eckstein, Liebigs Ann.Chem. 1289 (1976)
75) I. Photaki, D. Schäufele, S. Fallab, H. Erlenmeyer, Helv.Chim.Acta 20, 187 (1957)
76) G. Hillman, Z. für Naturforschung 1, 682 (1946)
77) H. Echner, persönliche Mitteilung
78) T. Schwan, J. Heterocycl.Chem. 4, 633 (1967)
79) W. Lautsch, B. Wiemer, P. Zechen-erlein, H.J. Kraege, W. Bandel, D. Günther, G. Schulz, H. Guitchel, Kolloid Z. 161, 36 (1958)
80) W. Lautsch, W. Gehrmann, R. Pasedag, K. Prater, Chem.Berichte 90, 457 (1957)
81) G. Losse, G. Müller, Z.Physiol.Chemie, 327, 205 (1962)
82) P.K. Worme, L.P. Hager, Biochemistry 9, 1599 (1970)
83) P,K. Worme, L.P. Hager, Biochemistry 9, 1600 (1970)
84) A.E. Vasilev, A.A. Khachatur'yan, B.N. Borisov, M.M. Ushakova, G.Ya. Rozenberg, Zh.Org.Khim, 8, 1973 (1972)
85) H.J. Callot, B. Castro, C. Selve, Tetrahedron Lett. 2877 (1978)

86) A.A. Khachatur'yan, L.S. Shishkanova, L.A. Gerasimovskaya, A.E. Vasilev, G.Ya. Rozenberg, Zh.Org.Khim 12, 1902 (1976)
87) A.E. Vasilev, L.S. Shishkanova, Zh.Org.Khim 14, 848 (1978)
88) A.S. Molokoldov, E.I. Filippovich, N.A. Kazakova, R.P. Estigneva, Zh.Obsh.Khimii 47, 1165 (1977)
89) C. Selve, F. Niedercorn, M. Narco, B. Chastro, M. Gabriel, Tetrahedron 37, 1893 (1981)
90) V.A. Radyukhin, E.I. Filipovich, R.P. Evstigneva, Th.Obs.Khim. 50, 673 (1980)
91) M. Momenteau, M. Rouget, B. Loock, Eur.J.of Bioch. 71, 63 (1976)
92) J. Geibel, J. Cannon, D. Campbell, I.G. Traylor, J.Am.Chem.Soc. 100, 3575 (1978)
93) C.K. Chang, J. Geibel, A. Berzinis, T. Mincey, J. Cannon, T.G. Traylor, J.Am.Chem.Soc. 101, 6716 (1979)
94) K.M. Smith, L.R. Milgrom, G.W. Kenner, J. of Ch.Soc. Perkin I, 2065 (1981)
95) A. van der Heijden, Dissertation, Universität Leiden 1972
96) N. Evans, D.E. Games, A.H. Jackson, S.A. Matlin, J.Chrom. 115, 325 (1975)
97) W.E. Eaton, R.M. Hochstrasser, J.Chem.Phys. 49, 985 (1968)
98) D.W. Smith, R.J.P. Williams, Structure and bonding 7, 1 (1969)
99) M. Gouterman in: The Porphyrins Vol. III
100) C. Hohmann, Persönliche Mitteilung S. 69
101) siehe 72) S. 33
102) siehe 72) S.
103) H. Mutter, Dissertation, Universität Tübingen 1978
104) H.O. Hill, A. Röder, R.J.P. Williams, Structure and bonding 8, 123 (1967)
105) P. Krauß. E. Heyer, Chem.Ztg. 183 (1977)
106) G.C. Roberts, Adv.Protein Chem. 24, 447 (1970)
107) J.C. Markley, Acc.Chem.Res. 8, 70 (1975)
108) Pretsch, Clerc, Seibel, Simon, Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen, Springer Verlag 1976

109) Engelhardt: Hochdruckflüssigkeitschromatographie, 2. Auflage, Springer Verlag
110) P. Hörchner, T. Rietveld, J.Chrom. 123, 414 (1976)
111) N. Evans, A.H. Jackson, S.A. Matlin, R. Towill, J.Chrom. 125, 345 (1976)
112) Z.J. Petryka, C.J. Watson, Anal.Bioch. 84, 173 (1978)
113) R. Bonnett, A. Charalambrides, K. Jones, I. Magnus, R.J. Ridge, Bioch.Jour. 173, 693 (1978)
114) V. Miller, L. Malina, J.Chrom. 145, 290 (1978)
115) L. Malina, V. Miller, I.A. Magnus, Clin.Chim.Acta 83, 55 (1978)
116) M.O. Longas, M.B. Poh-Fitzpatrick, Anal.Bioch. 104, 268 (1980)
117) H.D. Meyer, K. Jakobs, W. Vogt, M. Knedel, J.Chrom. 217, 473 (1981)
118) J.G. Straka, J.P. Kushner, B.F. Burnham, Anal.Bioch. 111, 269 (1981)
119) B.L. Karger, Anal.Chem. 50, 1048 (1978)
120) W. White in: The Porphyrins Vol. V, S. 317
121) R.J. Kurland, B.R. Garvey, J.Mag.Res. 2, 286 (1970)
122) J.P. Jesson in: G.N.La. Mar, W.D. Harrocks NMR of Paramagnetic Molecules, Kap. 1, Acad.Press, New York 1973
123) R.M. Lynden Bell in: "Progress of NMR Spektroskopie" Vol. 2, Kap. 4, Pergamon, Oxford 1967
124) H.M. Mc Connell, J.Chem.Phys. 32, 1326 (1960)
125) A.D. Mc Lachlan, Mol.Phys. 1, 233 (1958)
126) siehe 121) Kap. 3
127) siehe 121) Kap. 2
128) I. Solomon, Phys.Rev. 99, 559 (1955)
129) N. Bloembergen, J.Chem.Phys. 27, 572, 595 (1957)
130) N. Bloembergen, L.O. Morgan, J.Chem.Phys. 34, 842 (1961)
131) A. Carrington, G.R. Luckhurst, Mol.Phys. 8, 125 (1964)
132) M. Rubinstein, A. Baram, Z.Luz.Mol.Phys. 20, 67 (1971)

133) H.A.O. Hill, K.G. Morallee, J.Chem.Soc.Chem.Comm. 266 (1970)
134) J.A. Weightman, N.J. Hoyll, R.J.P. Williams, Bioch.Biophys.Acta 244, 567 (1971)
135) H. Degani, D. Fiat, J.Am.Chem.Soc. 93, 4281 (1971)
136) H.O. Hill, K.G. Morallee, J.Am.Chem.Soc. 94, 731 (1972)
137) E. Goldammer, H. Zorn, Eur.J.Biochem. 57, 291 (1975)
138) E. Goldammer, H. Zorn, J.Magn.Res. 23, 199 (1976)
139) E. Goldammer, H. Zorn, Biophys.Chem. 3, 249 (1975)
140) D. Budd, G.N. La Mar, K.C. Langry, K.M. Smith, R. Nayyir-Mazhir, J.Am.Chem.Soc. 101, 609 (1979)
141) K. Wütherich, R.Baumann, Helv.Chim.Acta 57, 341 (1974)
142) G.N. La Mar, F. Anm. Walker, J.Am.Chem.Soc. 95, 1782 (1973)
143) S.D. Satterlee, G.N. La Mar, J.Am.Chem.Soc. 98, 2804 (1976)
144) H. Goff, G.N. La Mar, Ch. Reed, J.Am.Chem.Soc. 99, 3641 (1977)
145) G.N. La Mar, T. Bold, J.D. Satterlee, Bioch.Biophys. Acta 498, 189 (1977)
146) G.N. La Mar, F.A. Walker in: "Teh Porphyrins", Vol. IV
147) J. Peisach, E.W. Blumberg, Kap. 2 A. D. Adler Anm.N.Y.Acad.Sci 206, 310 (1973)
148) M. Zerner, M. Gouterman, H. kobayashi, Theor.Chim. Acta 6, 363 (1966)
149) G.C. Barcket, D.L. Richards, W.S. Chaughey, J.Chem. Phys. 54, 4383 (1971)
150) P.A. Adams, D.A. Baldwin, C.E. Hepner, J.M. Pratt, Bioinorg.Chem. 9, 479 (1978)
151) E. Goldammer, H. Zorn, Mol.Phys. 32, 1432 (1976)
152) R.J. Kurland, R.G. Little, D.G. Davis, C. Ho, Biochemistry 10, 2237 (1971)
153) G.N. La Mar, F.A. Walter, J.Am.Chem.Soc. 94, 8607 (1972)
154) J.D. Satterlee, G.N. La Mar, J.S. Fryl, J.Am.Chem.Soc. 98, 7225 (1976)

155) G.N. La Mar, J.S. Frye, J.D. Satterlee, Bioc.Biophys. Acta 428, 78 (1976)
156) H. Goff, J.Am.Chem.Soc. 102, 3253 (1980)
157) R. Keller, G. Grondinsky, K. Wütherich, Biochem. Biophys. Acta 427, 497 (1976)
158) H. O'Keefe, C.H. Barlow, G.A. Smythe, W.H. Fuchsman, T.H. Moss, R.H. Lilienthal, W.S. Caughey, J.Bioinorg.Chem. 5, 125 (1975)
159) M. Widdas, R. Mustacich, D. Jayne, J.Am.Chem.Soc. 94, 4518 (1971)
160) F.A. Walker, M.W. Lo, M.T. Ree, J.Am.Chem.Soc. 98, 5552 (1976)
161) P. Stein, M. Mitchel, T. Spiro, J.Am.Chem.Soc. 102, 7797 (1980)
162) J.T. Landman, K. Hatano, W.R. Scheid, C.A. Reed, J.Am.Chem.Soc. 102, 6729 (1980)
163) W. R. Dunham. G. Palmer, R.H. Sands. A.J. Bearden, Bioch.Biophys.Acta 253, 373 (1971)
164) siehe 54) S. 48
165) H. Goff, J.Am.Chem.Soc. 103, 3714 (1981)
166) A.H. Corin, S.D. Bruck, J.Am.Chem.Soc. 80, 4736 (1958)
167) J.P. Collman, J.I. Brauman, K.S. Suslick, E. Rose, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 75, 1052 (1978)
168) siehe 52) Seite 71
169) J.P. Collman, J.I. Brauman, K.S. Suslick, J.Am.Chem. Soc. 97, 7185 (1975)
170) Organikum, 9. Auflage, VEB Verlin 1970 und Firmenschrift der Fa. Merck "Trocknen im Labor"
171) R.A. Fahrny, G. Pataki, Helv.Chim.Acta 44, 2202 (1961)
172) F. Reindel, W. Hoppe, Chem.Ber. 87, 1103 (1954)
173) S. Moore, D.H. Spackman, W.H. Stein. Anal.Chem. 30, 1185 (1958)
174) siehe 72) Seite 49
175) L. Caprino, J.Am.Chem.Soc. 78, 89 (1957)
176) N.C. Davis, J.Biol.Chem. 231, 935 (1956)

177) siehe 72) Seite 332

178) E. Schnabel, H. Herzog, P. Hoffmann, Liebigs Anm.Chem. 716, 175 (1968)

179) C.H. Li, D. Yamashiro, S. Lemaire, Biochemistry 14, 955 (1975)

180) J. Honzl, R. Rudinger, Coll.Czech.Chem.Comm. 26, 2333 (1961)

181) H. Hagenmaier, H. Frank , Hoppe-Seylers Z.Physiol. Chem. 353, 1973 (1972)

LEBENSLAUF

28.11.1951	Geburt in Stutgart Eltern: Dr.phil. Otto Bihler, Dipl.Bibliothekar Else Bihler, geb. Manz, Studienassesorin
1959 - 1963	Besuch der Grundschule im Internat Heiligenbronn (Kreis Freudenstadt)
1963 - 1971	Besuch des Friedrich-Eugen-Gymnasiums in Stuttgart
Juni 1971	Reifeprüfung abgelegt
WS 1971/72	Immatrikulation für die Studienfächer Biologie und Chemie für das höhere Lehramt an Gymnasien an der Universität Hohenheim
April 1974	Abschluß der Zwischenprüfung
Nov. 1975	Staatsexamen Chemie
Juni 1976	Staatsexamen Biologie
Dez. 1976 - Dez. 1979	praktischer Teil der Dissertation: "Synthese und Charakterisierung von kovalent an Hämin gebundenen imidazolhaltigen Liganden" am Lehrstuhl für Organische Chemie I der Universität Tübingen unter Leitung von Prof. Dr. Ernst Bayer
Febr. 1980 - Juli 1981	Studienreferendar am Studienseminar Heidelberg
Juli 1981	Ablegung der pädagogischen Prüfung für das Lehramt an Gymnasien
Sept. 1981 - Juni 1982	Theoretischer Teil der Dissertation
27. Juli 1979	Eheschließung mit Friederike Bihler, geb. Schneider

Meine akademischen Lehrer waren

in Tübingen

E. Bayer

in Hohenheim

G. Baumann, S. Beckmann, W. Eulenberger, H. v. Faber,
B. Frenzel, H. Geiger, H. Hahn, G. Hess, U. Körber-Grohne,
W. Kraus, K.H. Kreeb, G. Mechelke, O. Pflugfelder,
H. Rahmann, H. Rau, W. Rentschler